

Gabriela Regina Rosa Souza

**DESENVOLVIMENTO DE NANOPARTÍCULAS HÍBRIDAS
PARA TERAPIA POR RNA DE INTERFERÊNCIA:
SILENCIAMENTO DE GENES-CHAVE NA SOBREVIVÊNCIA
CELULAR EM CÂNCER DE MAMA**

Dissertação submetido(a) ao Programa
de Pós-graduação em Farmácia da
Universidade Federal de Santa
Catarina para a obtenção do Grau de
Mestrado em Farmácia na Área de
Concentração Fármaco-Medicamentos.
Orientadora: Prof^a. Dr^a. Tânia Beatriz
Creczynski Pasa
Co-orientador: Prof. Dr. Frederico
Pittella Silva

Florianópolis
2016

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca
Universitária da UFSC.

Souza, Gabriela Regina Rosa

Desenvolvimento de nanopartículas híbridas para terapia
por RNA de interferência : silenciamento de genes-chave na
sobrevivência celular em câncer de mama / Gabriela Regina
Rosa Souza ; orientadora, Tânia Beatriz Creczynski-Pasa ;
coorientador, Frederico Pittella Silva. - Florianópolis,
SC, 2016.

114 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós
Graduação em Farmácia.

Inclui referências

1. Farmácia. 2. siRNA. 3. Nanopartículas. 4. Copolímero.
5. Câncer de mama. I. Creczynski-Pasa, Tânia Beatriz . II.
Silva, Frederico Pittella. III. Universidade Federal de
Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Farmácia. IV.
Título.

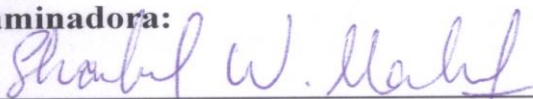
**"DESENVOLVIMENTO DE NANOPARTÍCULAS
HÍBRIDAS PARA TERAPIA POR RNA DE
INTERFERÊNCIA: SILENCIAMENTO DE GENES-
CHAVE NA SOBREVIVÊNCIA CELULAR EM
CÂNCER DE MAMA"**

POR

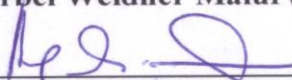
Gabriela Regina Rosa Souza

**Dissertação julgada e aprovada em
sua forma final pelo(a)
Orientador(a) e membros da
Banca Examinadora, composta
pelos Professores Doutores:**

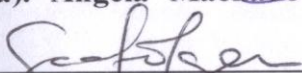
Banca Examinadora:



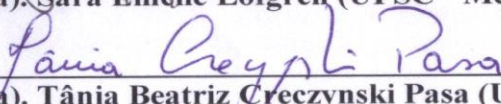
Prof(a). Dr(a). Sharbel Weidner Maluf (UFSC – Membro Titular)



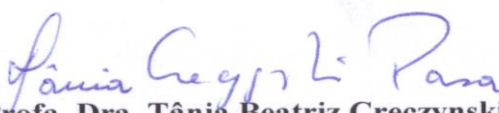
Prof(a). Dr(a). Ângela Machado de Campos (UFSC – Membro Titular)



Prof(a). Dr(a). Sara Emelie Löfgren (UFSC - Membro Titular)



Prof(a). Dr(a). Tânia Beatriz Creczynski Pasa (UFSC – Orientador(a))



**Prof(a). Dra. Tânia Beatriz Creczynski Pasa
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Farmácia da
UFSC**

Florianópolis, 26 de fevereiro de 2016.

Este trabalho é dedicado aos meus
colegas de laboratório e à minha
família.

AGRADECIMENTOS

Acima de tudo agradeço a Deus pela fé, esperança e motivação quando mais precisava.

À minha família que sempre se fez presente e torceu pelo meu sucesso.

Ao meu noivo Jorge Navarro Haberbeck Neto por todo o apoio, amor, ajuda e atenção dedicados a mim.

À minha orientadora, professora Tânia Beatriz Creczynski Pasa pelos ensinamentos, paciência, compreensão e disposição durante o trabalho.

Ao meu co-orientador professor Frederico Pittella Silva por ser uma pessoa tão dedicada e por todo o profissionalismo, apoio e ensinamentos que me transmitiu ao longo dos últimos anos.

Aos amigos pelos momentos compartilhados ao longo do mestrado, que, de alguma maneira, contribuíram para o desenvolvimento do trabalho.

A todos os colegas do Grupo de Estudos de Interações entre Micro e Macromoléculas-GEIMM, pela convivência e troca de experiências diárias.

Ao Jelver Alexander Sierra pelos ensinamentos e por me auxiliar na caracterização das nanopartículas.

Aos professores Tânia Frode e Eduardo Dalmarco por disponibilizarem o laboratório para as análises de qPCR.

Ao professor Márcio Martinez Alvarez por permitir as quantificações de RNA em seu laboratório.

Ao Laboratório Central de Microscopia Eletrônica da UFSC (LCME) pela oportunidade de utilização do Microscópio Eletrônico de Transmissão, Microscópio de Confocal e medidas EDS, em especial, a Eliana Oliveira por todas as sessões realizadas no LCME.

Ao Laboratório de Farmacotécnica da UFSC pela utilização do liofilizador.

Ao Centro Brasileiro de Pesquisas Físicas pela ajuda com as medidas de XPS.

Ao Laboratório Multiusuário de Estudos em Biologia pelos aparelhos disponibilizados.

Aos membros da banca examinadora, pela disponibilidade em avaliar e contribuir com este trabalho.

Ao programa de Pós Graduação em Farmácia da UFSC que possibilitou o desenvolvimento desta dissertação.

Ao CNPQ, CAPES e FAPESC, pelo suporte financeiro.

RESUMO

Desde a elucidação do mecanismo molecular do efeito RNA de interferência (RNAi), sequências de short interfering RNA (siRNA) emergiram como potenciais agentes terapêuticos para modular a produção de proteínas relacionadas à doenças envolvidas na desregulação genética. Entretanto, a aplicação clínica do siRNA depende do desenvolvimento de sistemas de entrega seguros e eficientes para as células alvo, uma vez que o siRNA é facilmente degradado por nucleases endógenas, a absorção celular é ineficiente, além de ocorrer aprisionamento e degradação das moléculas nos endossomos celulares. Sendo assim, o objetivo do presente estudo foi o desenvolvimento de um sistema de entrega eficiente para proteger e entregar o siRNA às células de câncer de mama, visando o uso na terapia anti-câncer. Para tanto, nanopartículas híbridas compostas de fosfato de cálcio e copolímero foram preparadas, caracterizadas e testadas em células. As nanopartículas foram formadas por auto-associação, através de mistura simples e estequiométrica de soluções iônicas aquosas contendo siRNA e copolímero. As medidas de espalhamento dinâmico de luz (DLS) indicaram uma distribuição de tamanho estreita com diâmetro médio em 53 ± 4 nm e índice de polidispersão (PdI) de $0,09 \pm 0,02$. A carga superficial das nanopartículas foi de $0,25 \pm 0,22$ mV. As imagens de TEM revelaram nanopartículas com forma arredondada relativamente homogênea, com tamanho médio de 47 ± 18 nm. A concentração de partículas foi de $1,72 \times 10^{12}$ /mL. A porcentagem de siRNA complexado nas nanopartículas foi de 45%, conforme quantificado por pelo kit Quanti-iT microRNA Assay e visualizado por gel de agarose. O sistema desenvolvido permaneceu estável durante a incubação prolongada a 4°C e por 7 dias quando submetido ao congelamento/descongelamento. Observou-se que os processos de liofilização, purificação e adição ao meio de cultura de células não alteraram o tamanho e o PdI das nanopartículas. Os ensaios de Espectroscopia de Emissão de Fotoelétrons Excitados por raios X (XPS) e Espectroscopia de raios X por dispersão em energia (EDS) sugeriram a presença dos elementos oxigênio, cálcio, fósforo, nitrogênio e carbono na composição das nanopartículas indicando associação conforme a hipótese levantada. As nanopartículas contendo o siRNA para AKT3 e SETD4 reduziram a viabilidade celular de maneira dependente de concentração e do tempo quando comparadas com os respectivos controles. As nanopartículas não foram citotóxicas para a linhagem celular não tumoral NIH-3T3. As nanopartículas híbridas mostraram-se eficientes no carreamento e

entrega do siRNA, uma vez que foi possível observar silenciamento de $46 \pm 13\%$ para o gene AKT3 e $42 \pm 34\%$ para SETD4. Por microscopia confocal confirmou-se a capacidade do sistema nanoparticulado em carrear siRNA e promover o escape endossomal. Os resultados obtidos demonstram a nanopartícula híbrida como uma candidata promissora na entrega de siRNA para genes importantes na sobrevivência de células de câncer de mama.

Palavras-chave: siRNA. Nanopartículas. Copolímero. Câncer de mama.

ABSTRACT

DEVELOPMENT OF HYBRID NANOPARTICLES FOR RNA INTERFERENCE THERAPY: SILENCING KEY GENES FOR THE CELL SURVIVAL IN BREAST CANCER

Since elucidation of the molecular pathway of ribonucleic acid interference (RNAi), short interfering ribonucleic acid (siRNA) has emerged as a potential therapeutic agent for modulating the production of proteins associated with diseases involved in gene disruption. However, the clinical application of siRNA requires safe and effective methods for their delivery to the target cell, due to the siRNA degradation by nucleases, inefficient cellular uptake and endosomal entrapment. Thus, the aim of the present study was the development of an efficient carrier system to protect and deliver siRNA to breast cancer cells for anti-cancer therapy. Therefore, hybrid nanoparticles composed of calcium phosphate and block copolymer were prepared, characterized and tested biologically. The nanoparticles were formed through self-assembly by simple mixing of aqueous ionic solutions of the components in stoichiometric condition, in the presence of siRNA and block copolymer. Dynamic Light Scattering (DLS) measurements showed a narrow distribution with an average value of 53 ± 4 nm and Polydispersity Index (PdI) of 0.09 ± 0.02 . The surface charge of nanoparticles was $0.25 \text{ mV} \pm 0.22 \text{ mV}$. The TEM observations revealed nanoparticles with relatively homogenous rounded shape with an average size of 47 ± 18 nm. The concentration of particles per mL was 1.72×10^{12} . The siRNA-loading efficiency was 45%, as quantified by the Quant-iT microRNA Assay kit and visualized by agarose gel electrophoresis. The developed system remained stable during prolonged incubation at 4°C , and for 7 days when subjected to freeze/thaw. It was noted that the freeze-drying processes, purification as well as the presence of cell culture medium did not change the size and PdI of the nanoparticles. Photoelectron spectroscopy Emission Excited by X-ray (XPS) and X-ray spectroscopy for energy dispersion (EDS) suggest the presence of oxygen, calcium, phosphorus, nitrogen and carbon in the composition of nanoparticles, indicating association as the hypothesis of nanoparticles formation. Nanoparticles containing siRNA to AKT3 and SETD4 significantly reduced cell viability in a concentration- and time-dependent manner, when compared to the control. Nanoparticles are not cytotoxic to NIH-3T3 cell line (non-tumoral). The hybrid nanoparticle was efficient in loading and

delivering siRNA, since it was observed a AKT3 and SETD4 gene silencing of $46 \pm 13\%$ and $42 \pm 34\%$, respectively. By confocal microscopy the abilities of the nanoparticulate system to deliver siRNA and to promote endosomal escape were confirmed. The results obtained demonstrate the hybrid nanoparticles as a promising candidate for the delivery of siRNA to silence key genes in the survival of breast cancer cells.

Keywords: siRNA. Nanoparticles. Copolymer. Breast cancer.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Tecido de mama normal.....	27
Figura 2 –Estrutura da isoforma AKT3 e mecanismo de ativação da via PI3K/AKT no câncer.....	30
Figura 3 – Representação esquemática das estruturas dos genes e proteínas primárias de SETD4.	33
Figura 4 – Mecanismo de RNA de interferência.....	37
Figura 5 – Representação esquemática da acumulação passiva das nanopartículas no tumor, devido ao efeito EPR.	44
Figura 6 – Caracterização das nanopartículas híbridas.	65
Figura 7 – Espectro de fotoemissão das nanopartículas híbridas.	66
Figura 8 – Espectro de EDS das nanopartículas híbridas.....	68
Figura 9 – Representação esquemática do processo de incorporação de ácidos nucleicos ao sistema nanoparticulado.	69
Figura 10 – Eletroforese em gel de agarose.	71
Figura 11 – Mudança no diâmetro relativo e potencial zeta dependente do tempo e temperatura das nanopartículas híbridas.....	72
Figura 12 – Tamanho das nanopartículas híbridas através do histograma determinado por medida de DLS.....	75
Figura 13 – Caracterização por DLS das nanopartículas híbridas após processo de purificação.	76
Figura 14 – Viabilidade celular, com diferentes tratamentos, utilizando nanocarreadores NP PEG-poliânion/siAKT3/CaP em células de câncer de mama MDA-MB-231.	78
Figura 15 – Viabilidade celular, com diferentes tratamentos, utilizando nanocarreadores NP PEG-poliânion/siSETD4/CaP em células de câncer de mama MDA-MB 231.	80
Figura 16 – Citotoxicidade do sistema NP PEG-Poliânion/siRNA/CaP em células não tumorais NIH-3T3.	82
Figura 17 – Expressão dos genes AKT3 e SETD4 em células de câncer de mama após tratamento com os nanocarreadores contendo siRNA...	84
Figura 18 – Localização intracelular das nanopartículas por microscopia confocal.	86

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Condições da reação de qPCR para os genes AKT3 e SETD4.....	59
--	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Principais barreiras para liberação sistêmica de siRNA utilizando nanocarreadores.....	39
Tabela 2 – Alguns sistemas de entrega à base de RNAi em ensaios clínicos.	46
Tabela 3 – Medidas de DLS e potencial zeta após liofilização.	73

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

a.u- Unidades Arbitrárias
A- Adenina
AKT- V-akt oncogene viral timoma murino homólogo
AKT1- V-akt oncogene viral timoma murino homólogo 1
AKT2- V-akt oncogene viral timoma murino homólogo 2
AKT3- V-akt oncogene viral timoma murino homólogo 3
AMP- Adenosina monofosfato
ANOVA- Análise de Variância
ATM- Ataxia Telangiectasia Mutated
BLAST- Ferramenta de Busca de Alinhamento Básico Local
BRCA1- Câncer de mama 1
BRCA2- Câncer de mama 2
C- Citosina
CaP- Fosfato de Cálcio
CDH1- Cadherin-1
cDNA- DNA complementar
CHEK2- Checkpoint Kinase 2
Cy5- Fluorocromo Cianina 5
d.nm- Diâmetro hidrodinâmico
DAPI- 4',6-diamidino-2-phenylindole
DLS- Dynamic Light Scattering
DMEM- Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO- Dimetil Sulfóxido
DP- Grau de Polimerização
dsRNA- Double Strand RNA
EDS- Espectroscopia de Raios X por Dispersão em Energia
EDTA- Ácido Etilenodiaminotetraacético
EPR - Aumento da Permeabilidade e Retenção
ER- Receptor de Estrogênio
eV- Elétron-Volt
fps- Frames por Segundo
G- Guanina
GMP- Guanosina Monofosfato
HAp- Hidroxiapatita
HCl- Ácido clorídrico
He-Ne- Hélio-Neônio
HEPES- Ácido N-[2-Hidroxietil]piperazina-N'-[2-etanosulfônico]
HER2- Human Epidermal Growth Factor Receptor 2

kV- Quilovolt
mbar- Mili bar
MEV- Microscopia Eletrônica de Varredura
miRNA- micro RNA
Mock- Nanopartícula vazia
MTT - Brometo de dimetiazoldifeniltetrazólio
mV- Milivolt
 $\text{Na}_3\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ - Fosfato de Sódio Dodecahidratado
Nacked- siRNA livre
NF-kB- Factor Nuclear Kappa B
NP- Nanopartícula
OMS- Organização Mundial da Saúde
PALB2- Parceiro e localizador de BRCA2
pb- Pares de Base
PdI- Índice de Polidispersão
PEG- Polietileno(glicol)
PEG-PAA- Poli(etilenoglicol)- bloco- poli(ácido aspártico)
PEG-PAsp - Poli(etileno glicol)-bloco-poliaspartato
PI3K- Phosphoinositide 3-kinase
PTEN- Fosfatase e tensina homóloga
RISC- Complexo de Indução de Silenciamento de RNA
RNA- Ácido Ribonucléico
RNAi- RNA de interferência
RNAm- RNA mensageiro
RT-PCR- Transcrição reversa-reação em cadeia da polimerase
SETD4- Domínio contendo SET 4
SFB - Soro Fetal Bovino
siRNA cy5- siRNA marcado com cyanine 5
siRNA- short interfering RNA
STK11- Serine/Threonine Kinase 11
T- Timina
TEM- microscopia de transmissão eletrônica
TP53- Proteína tumoral 53
U- unidade
UTR - Prime Untranslated Region
U- Uracila
VEGF- Vascular Endothelial Growth Factor
XPS- Espectroscopia de Emissão de Fotoelétrons Excitados por

raios X

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	23
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	25
2.1 CÂNCER DE MAMA	25
2.1.1 Classificação Histológica do Câncer de Mama	25
2.1.2 Fatores de risco	26
2.1.3 Prevenção, Sintomas e Detecção	27
2.1.4 Genes envolvidos na proliferação celular em câncer de mama	28
2.1.4.1 V-akt murine thymoma viral oncogene homolog 3 (AKT3)	28
2.1.4.2 SET domain-containing Protein 4 (SETD4)	31
2.1.5 Tratamento do câncer de mama	33
2.2 RNA DE INTERFERÊNCIA E SHORT INTERFERING RNA	35
2.2.1 Nanocarreadores para a transfecção de siRNA	38
2.2.1.1 Fosfato de cálcio (CaP)	40
2.2.1.2 Polímeros sintéticos	42
2.2.2 Acumulação passiva nas células e tecidos alvos	43
2.2.3 Estado atual em ensaios clínicos de terapia por siRNA	44
3. OBJETIVOS	49
3.1 OBJETIVO GERAL	49
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	49
4. MATERIAIS E MÉTODOS	51
4.1 MATERIAIS	51
4.2 CONSTRUÇÃO DAS SEQUÊNCIAS DE siRNA TERAPÊUTICO	51
4.3 PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE NANOCARREADORES	52
4.3.1 Preparação das nanopartículas híbridas PEG-poliânion / siRNA / CaP	52
4.3.2 Determinação da forma, tamanho médio, distribuição de tamanho e concentração das nanopartículas híbridas	52
4.3.2.1 Avaliação do diâmetro hidrodinâmico e distribuição de tamanho das nanopartículas híbridas por DLS	52
4.3.2.2 Avaliação da morfologia, tamanho e distribuição de tamanho das nanopartículas híbridas por TEM	53
4.3.2.3 Determinação da concentração das nanopartículas híbridas por NTA	53
4.3.3 Determinação da carga superficial das nanopartículas híbridas	54
4.3.4 Análise de composição elementar do sistema carreador	54
4.3.4.1 Espectroscopia de emissão de fotoelétrons excitados por raios X (XPS)	54
4.3.4.2 Espectroscopia de raios X por dispersão em energia (EDS)	55
4.3.5 Eficiência de incorporação do siRNA	55
4.3.6 Avaliação da estabilidade do sistema carreador	56
4.3.6.1 Estudo da estabilidade coloidal em condições normais de armazenamento	56
4.3.6.2 Estudo preliminar da secagem por liofilização	56

4.3.6.3 Estabilidade em condições salinas	57
4.3.7 Purificação das nanopartículas híbridas	57
4.4 CITOTOXICIDADE E SILENCIAMENTO DA EXPRESSÃO GÊNICA <i>IN VITRO</i> INDUZIDA POR siRNA CARREADO EM NANOPARTÍCULAS HÍBRIDAS PEG-POLIÂNION/siRNA/ CaP	57
4.4.1 Cultura celular	57
4.4.2 Viabilidade celular.....	58
4.4.3 PCR quantitativo	59
4.4.4 Observação da internalização celular das nanopartículas híbridas por Microscopia Confocal.....	59
4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA	60
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	61
5.1 SELEÇÃO DOS GENES ALVO E SEQUENCIAS DE siRNA	61
5.2 AUTOMONTAGEM E CARACTERIZAÇÃO DA NANOPARTÍCULA HÍBRIDA PEG-POLIÂNION/siRNA/CaP	62
5.3 ESPECTROSCOPIA DE EMISSÃO DE FOTOELÉTRONS EXCITADOS POR RAIOS X (XPS)	65
5.4 ESPECTROSCOPIA DE RAIOS X POR DISPERSÃO EM ENERGIA (EDS).....	67
5.5 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS HÍBRIDAS	69
5.6 EFICIÊNCIA DE INCORPORAÇÃO DO siRNA.....	70
5.7 ESTUDO DA ESTABILIDADE COLOIDAL.....	71
5.8 ESTUDO PRELIMINAR DA LIOFILIZAÇÃO DAS FORMULAÇÕES ..	72
5.9 DETERMINAÇÃO DO TAMANHO DE DISTRIBUIÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS HÍBRIDAS APÓS ADIÇÃO DE MEIO DE CULTURA	74
5.10 PURIFICAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS HÍBRIDAS	75
5.11 VIABILIDADE CELULAR	76
5.12 AVALIAÇÃO DO SILENCIAMENTO GÊNICO.....	83
5.13 INTERNALIZAÇÃO CELULAR DAS NANOPARTÍCULAS HÍBRIDAS POR MICROSCOPIA CONFOCAL.....	84
6. CONCLUSÃO.....	87
7. PERSPECTIVAS.....	89
8. REFERÊNCIAS.....	91
APÊNDICE A – Imagem das nanopartículas híbridas PEG-poliânion/siRNA/CaP	109
APÊNDICE B – Curva padrão de siRNA.....	110
APÊNDICE C – Curvas de Eficiência dos iniciadores.	111
APÊNDICE D – Processo de submissão ao Instituto Nacional da Propriedade Industrial para pedido de proteção a propriedade intelectual.....	113

1. INTRODUÇÃO

O câncer é um grupo amplo de doenças caracterizadas pelo crescimento e proliferação celular desordenado em determinado tecido, causando complicações fisiológicas. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), o número de casos de câncer cresce anualmente, sendo que em 2012, houve 14,1 milhões de novos casos de câncer, 8,2 milhões de mortes por câncer e 32,6 milhões de pessoas vivendo com câncer em todo o mundo (WHO, 2016).

Entre todos os tipos de câncer, o de mama é o segundo mais comum e o mais frequente no sexo feminino, tanto em regiões desenvolvidas, quanto em desenvolvimento, com uma estimativa de 1,3 milhões de novos casos diagnosticados a cada ano. Constitui também a maior causa de mortalidade em mulheres (0,5 milhões/ano), sendo a quinta causa de morte, considerando todas as formas de câncer (BRASIL, 2016a; BENSON; JATOI, 2012; FERLAY et al., 2010).

No caso do câncer de mama, as modalidades de tratamento podem ser divididas em tratamento local, que inclui a cirurgia e radioterapia, bem como o tratamento sistêmico, envolvendo quimioterapia, hormonioterapia e terapia biológica ou imunoterapia. Entretanto, os tratamentos convencionais para o câncer não atingem somente as células tumorais, mas também os tecidos saudáveis, os quais passam a apresentar uma série de efeitos adversos que podem levar a intoxicações severas. Desenvolver terapias menos tóxicas e mais seletivas, portanto mais eficazes, tornou-se uma prioridade na pesquisa translacional anti-câncer (BRASIL, 2016b).

A utilização do efeito de RNA de interferência (RNAi), para o silenciamento específico de genes super-expressos em doenças, se apresenta como uma estratégia relevante com potencial de aplicação terapêutica. Essa terapia prevê a inibição da expressão de genes específicos, e com isso, a redução da produção de proteínas, conforme o estabelecido no dogma Central da Biologia Molecular.

Existem diversos genes que apresentam expressão diferenciada em linhagens de câncer de mama e poderiam ser alvos terapêuticos de silenciamento gênico através de RNAi. Entre eles, o produto do gene AKT (*v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 3*) é essencial para a sobrevivência e proliferação das células de câncer e o SETD4 (*SET Domain Containing 4*), que se encontra superexpresso em células de câncer de mama humanas, é crucial para o desenvolvimento do câncer de mama, cuja regulação está associada com a proliferação da

linhagem celular de câncer da mama MDA-MB-231 (FARIA, 2013; SANTI; LEE, 2011).

Desta forma, a utilização de *short interfering* RNA (siRNA) codificando genes alvos nas células de câncer permitirá a clivagem do RNAm (RNA mensageiro) complementar, para promover a redução da produção da proteína que o gene codifica, induzindo, em teoria, a morte celular. Entretanto, as moléculas de siRNA são vulneráveis a degradação por enzimas endógenas, apresentam alta massa molecular (~13kDa), além de serem negativamente carregadas. Estas características tornam o siRNA frágil e são empecilhos em relação a passagem através das membranas celulares. Desta forma, para a aplicação do efeito de RNAi contra genes envolvidos com o desenvolvimento do câncer de mama, o uso de nanocarreadores torna-se necessário para proteger as moléculas de siRNA e garantir a obtenção do efeito de interferência (PITTELLA et al., 2012).

Nesta dissertação, apresenta-se o desenvolvimento de um sistema de nanopartículas inorgânico-orgânico composto por fosfato de cálcio e copolímero de Polietileno(glicol)-poliânion preparado através de auto-associação, eficiente para a entrega de siRNA complementar aos genes AKT3 e SETD4, para terapia contra o câncer de mama.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 CÂNCER DE MAMA

O câncer corresponde a um grupo de doenças que possuem em comum o descontrole no crescimento e na proliferação celular, podendo invadir órgãos ou partes do corpo adjacentes ao foco inicial. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), cerca de 7,6 milhões de pessoas morreram de câncer em 2008 e a estimativa para 2030 é de 13 milhões de mortes (WHO, 2016).

Entre os tipos de câncer, o de mama é o tipo mais comum entre as mulheres, é a maior causa de mortalidade e uma das principais causas de morbidade em mulheres de todo o mundo (FERLAY, 2012). É um dos tipos de câncer mais comuns estimados para 2016. Pode ocorrer em homens e mulheres, mas é muito raro nos homens (NCI, 2015).

No Brasil, a incidência de câncer de mama no sexo feminino (53 mil casos novos/ano) está em segundo lugar entre todos os tipos de câncer, precedido somente pelo câncer de pele não melanoma (71 mil casos novos/ano). O número de mortes registrado em 2013 é de 14.388, sendo 181 homens e 14.207 mulheres. Além disso, são esperados 57.960 novos casos para o ano de 2016 (BRASIL, 2015; BRASIL, 2016a). No entanto, esta prevalência não se comporta da mesma forma quando a análise é regional. Em relação ao sexo feminino, sem considerar os tumores de pele não melanoma, o câncer de mama lidera nas regiões Regiões Sul (74,30/100 mil), Sudeste (68,08/100 mil), Centro- Oeste (55,87/100 mil) e Nordeste (38,74/100 mil). Na região Norte do país, é o segundo tumor mais incidente (22,26/100 mil), seguido do câncer de colo do útero (BRASIL, 2015).

2.1.1 Classificação Histológica do Câncer de Mama

O câncer de mama é um grupo de doenças muito heterogêneo composto por múltiplos subgrupos associados a características biológicas e histológicas distintas, com diferentes formas de manifestações clínicas e padrões de resposta às terapias vigentes. A classificação dos tumores é essencial na oncologia moderna, auxiliando na reprodutibilidade diagnóstica e prognóstica (GOBBI, 2012).

De acordo com a classificação de tumores de mama da OMS, os tumores não invasivos incluem o carcinoma ductal e lobular in situ. Os tumores invasivos são reconhecidos como carcinoma mamário invasivo de tipo não especial e mais de 20 tipos histológicos especiais, definidos

por critérios morfológicos. Entre aqueles, o carcinoma mamário invasivo de tipo não especial corresponde a cerca de 70% dos casos e é identificado como uma neoplasia epitelial mamária invasiva que não preenche os critérios para os tipos especiais, constituindo um grupo de tumores heterogêneo. Já os tipos histológicos especiais, dos quais o carcinoma lobular invasivo é o mais prevalente, são mais homogêneos e com critérios diagnósticos mais rígidos. Uma mesma neoplasia pode apresentar áreas com diferentes morfologias, sendo considerada neoplasias de padrão misto (TAVASSOLI; DEVILEE, 2003).

Porém, a classificação histológica do câncer de mama acaba provocando o agrupamento de tumores com um amplo espectro biológico e de comportamento clínico dentro das mesmas categorias. Assim, a avaliação molecular da expressão de receptores de estrogênio, progesterona e HER2 (Human Epidermal Growth Factor Receptor 2) tem um papel fundamental para aumentar o valor discriminatório entre os diferentes subtipos (VIALE, 2012).

2.1.2 Fatores de risco

Os fatores de risco estão relacionados com a maior chance de desenvolver o câncer de mama. Todavia, se enquadrar em um ou mais fatores de risco não significa que a doença irá aparecer, uma vez que seu desenvolvimento é uma mistura de fatores genéticos e ambientais. Muitas mulheres que têm fatores de risco para o desenvolvimento do câncer de mama não irão apresentar a doença (BRASIL, 2016a).

Primeiramente, ser mulher é o principal fator de risco para o desenvolvimento do câncer de mama, porém, o homem poderá, sim, desenvolvê-lo. Isto pode ser explicado pela presença dos hormônios femininos estrogênio e progesterona, envolvidos no crescimento de células de câncer de mama. A idade também deve ser considerada, sendo que à medida que se envelhece, o risco de desenvolver câncer de mama aumenta, especialmente após os 50 anos. (BRASIL, 2016a; CDC, 2016).

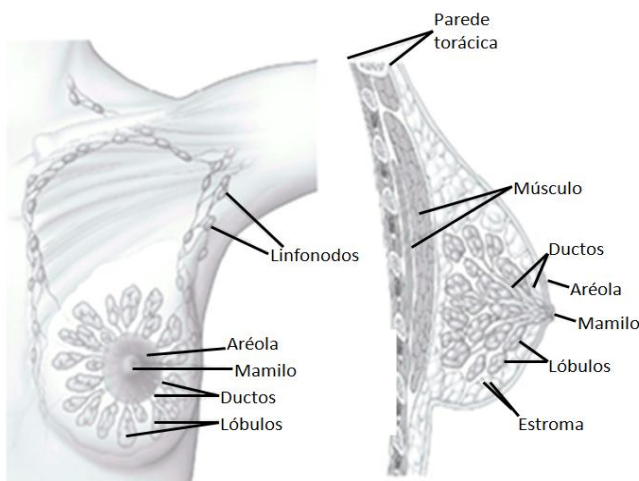
Além desses fatores, 5 a 10% dos casos de câncer de mama podem ocorrer devido à hereditariedade. Mutações herdadas nos genes BRCA1 e BRCA2 são as principais causas e ocorrem frequentemente em mulheres mais jovens afetando as duas mamas. Outras mutações também podem ocorrer, entretanto são mais raras, como por exemplo: ATM, TP53, CHEK2, PTEN, CDH1, STK11 e PALB2 (CDC, 2016; BRASIL, 2016a; NAROD; SALMENA, 2011; YARI; PAYANDEH; RAHIMI, 2015).

Outros fatores de risco incluem: maus hábitos alimentares, histórico familiar, tecido mamário denso, lesões, radiação, mulheres que não tiveram filhos, terapia hormonal após menopausa, uso de anticoncepcional, hábito de fumar, sedentarismo, entre outros (ANSA et al., 2015; BRASIL, 2016a 2015; KASAJOVA et al., 2015).

2.1.3 Prevenção, Sintomas e Detecção

A mama feminina é composta principalmente de lóbulos, que consistem em glândulas produtoras de leite; ductos, que são pequenos tubos que transportam o leite dos lóbulos ao mamilo e estroma, o qual é composto de tecido adiposo e tecido conjuntivo, vasos sanguíneos e linfáticos (Figura 1). A maioria dos cânceres de mama têm início nas células que revestem os ductos (ductal), alguns começam nas células que revestem os lóbulos (lobular), enquanto um pequeno número inicia em outros tecidos (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2016a).

Figura 1 – Tecido de mama normal.



Fonte: Adaptado de AMERICAN CANCER SOCIETY (2016a).

A prevenção do câncer de mama deve ser realizada principalmente através do controle dos fatores de risco. Estima-se que com alimentação saudável e realização de atividade física é possível reduzir em até 28% o risco do desenvolvimento da doença. Evitar a

obesidade e o consumo de bebidas alcoólicas é recomendação básica para prevenção. Além disso, a amamentação é considerada um fator protetor. A terapia de reposição hormonal deve ser realizada quando indicada pelo médico, pelo mínimo de tempo necessário (BRASIL, 2016a).

Para a detecção precoce da doença, deve-se ficar atento aos sinais e sintomas. A principal manifestação é o nódulo, fixo e que normalmente não provoca dor. Outros sinais e sintomas são: pele da mama avermelhada, retraída ou murcha; alterações na aréola; pequenos nódulos nas axilas ou no pescoço e saída de líquido anormal das mamas. A orientação é a realização de autopalpação das mamas sempre que possível e também de mamografia. A recomendação, no Brasil, é que mulheres entre 50 e 69 anos façam uma mamografia a cada dois anos. Portanto, a atenção das mulheres em relação às mamas é de extrema importância para a redução de novos casos de câncer (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2016a; BRASIL, 2016a).

2.1.4 Genes envolvidos na proliferação celular em câncer de mama

2.1.4.1 V-akt murine thymoma viral oncogene homolog 3 (AKT3)

Entre os genes envolvidos com o desenvolvimento do câncer, o gene AKT desempenha um papel crucial na regulação do crescimento celular, proliferação e sobrevivência. A ativação constitutiva do AKT está associada ao desenvolvimento de tumores, mau prognóstico e resistência a agentes anticancerígenos (NICHOLSON; ANDERSON, 2002). AKT/PKB (Proteína Quinase B) é uma serina/treonina quinase, da via PTEN/PI3K/AKT, que pertence à família AGC das quinases (AMP/GMP quinases e proteína quinase C) e apresenta três isoformas: AKT1, AKT2 e AKT3. Essa via regula a proliferação celular, sobrevivência, crescimento, motilidade e angiogênese (BELLACOSA et al., 2005; HANADA; FENG; HEMMINGS, 2004).

O mecanismo de ativação da via PI3K / Akt é ilustrado na Figura 2. Os fatores de crescimento ligam-se aos receptores das células para promover a ativação e a fosforilação de alvos, tais como, Gab1, com a criação de locais de ligação de fosfotirosina para proteínas que contêm os domínios SH2, como a subunidade reguladora de PI3K, p85. A subsequente ativação de PI3K inicia a sinalização da via (BROGNARD; HUNTER, 2011).

A superativação de AKT foi reportada em diversos tipos de câncer, incluindo mama, tireoide, gástrico, pulmão, pancreático, ovário, próstata e renal (FRANKE et al., 2003; LUO; MANNING; CANTLEY, 2003). Além disso, a via PI3K e AKT é ativada após radiação ionizante, conferindo resistência ao tratamento do câncer por radioterapia. Assim, a inibição da sinalização de PI3K e AKT aumenta a eficácia da terapia por radiação em muitos tipos de câncer (SCHUURBIERS et al., 2009).

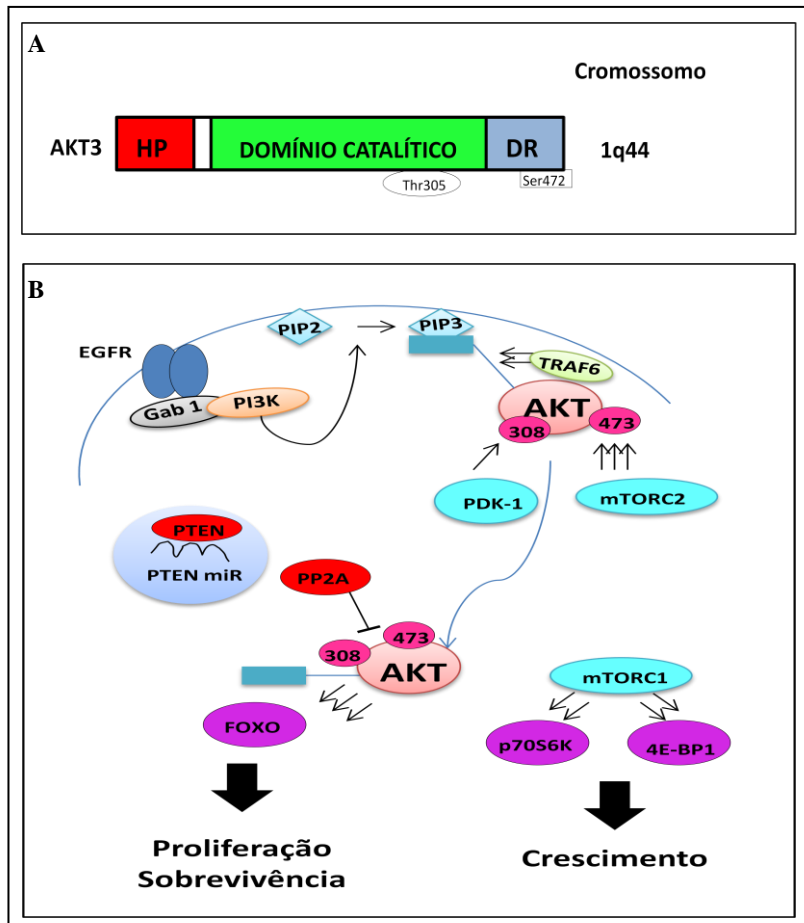
Foi descoberto recentemente que AKT1, 2 e 3 estão localizados principalmente no citoplasma, mitocôndria e núcleo, respectivamente, em muitas linhagens celulares de câncer, incluindo as de colo do útero, mama e de câncer de próstata. Esta localização subcelular específica pode, em última análise, ser a base da regulação das funções específicas das isoformas da proteína. Assim, foi levantada a hipótese de que uma determinada isoforma de AKT pode ser mais importante para a sobrevivência das células do que as outras (SANTI; LEE, 2010).

De acordo com Santi e Lee (2010), AKT2 aumenta a proliferação de células de câncer de mama MDA-MB-231, facilitando a progressão do ciclo celular e protegendo a célula da autofagia patológica, por meio da modulação da homeostase mitocondrial. Estes achados evidenciam que AKT2 pode ser um alvo eficaz para o controle do câncer de mama.

Outros estudos mostram, no entanto, que AKT3 (Figura 2) está intimamente envolvido na regulação do crescimento de células de câncer de mama com um imunofenótipo triplo-negativo, caracterizado por tumores que não apresentam receptor de estrogênio, progesterona e HER2 (Human Epidermal growth factor Receptor 2), e demonstram que a inibição específica de AKT3 deve ser explorada para fins terapêuticos (CHIN et al., 2014; IWASE et al., 2010; KOSEOGLU et al., 2007).

Assim, o silenciamento do gene AKT3, bem como dos genes AKT1 e 2 emerge como alvo potencial para a melhora do prognóstico do tratamento de câncer de mama.

Figura 2 –Estrutura da isoforma AKT3 e mecanismo de ativação da via PI3K/AKT no câncer.



A. Isoforma AKT3 possui um domínio catalítico (quinase) na região central da molécula. O domínio HP (Homologia de Plestrina) funciona como um módulo de ligação fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato. DR (Domínio Regulador) está localizado na extremidade C-terminal, adjacente ao domínio quinase. Locais de fosforilação do domínio catalítico e do DR são indicados. A localização no cromossomo do gene que codifica Akt3 também se encontra destacada. Fonte: Adaptado de Martelli et al. (2012). B. O mecanismo de ativação da via PI3K/AKT é ilustrada para células tumorais. Os fatores de crescimento ligam aos seus receptores, como EGFR (Receptor do Fator de Crescimento

Epidermal), para promover sua ativação e fosforilação de Gab1, A subsequente ativação de PI3K inicia o processo de sinalização da via. EGFR, receptor do fator de crescimento epidermal; Gab 1, GRB2, proteína de ligação associada 1; PI3K, fosfoinositídeo 3-quinase; PIP2, fosfatidilinositol difosfato; PIP3, fosfatidilinositol trifosfato; TRAF6, receptor TNF associado ao fator 6; AKT, V-akt oncogene viral timoma murino homólogo 3; PDK-1, 3-fosfoinositol-dependente proteína quinase 1; mTORC2, complexo alvo da rapamicina em mamíferos 2; PTEN, Fosfatase e tensina homóloga; PTEN miR, microRNA PTEN; PP2A, proteína fosfatase 2; mTORC1, complexo alvo da rapamicina em mamíferos 1; p70S6K, p70S6 quinase; 4E-BP1, 4E-proteína ligante 1; FOXO, caixa Forkhead. Fonte: Adaptado de Brognard e Hunter (2011).

2.1.4.2 SET domain-containing Protein 4 (SETD4)

As histonas são pequenas proteínas que funcionam como uma matriz onde o DNA se enrola, contendo uma cauda aminoterminal flexível, e possuem um papel fundamental na regulação de genes. Ao redor destas proteínas, encontram-se os nucleossomos, que apresentam aproximadamente 146 pares de bases de DNA, constituindo a unidade fundamental da cromatina; esta funciona como um modelo fisiológico dinâmico na regulação de vários processos nucleares, incluindo transcrição do DNA, replicação, reparo, mitose e apoptose (FISCHLE; WANG; ALLIS, 2003; JENUWEIN; ALLIS, 2001; MELLOR, 2006).

As caudas N-terminal das histonas estão sujeitas a modificações por ligações covalentes pós-traducionais. Estas modificações compreendem a acetilação, fosforilação, metilação, ubiquitinação, entre outras, e afetam a função dos cromossomos (JENUWEIN; ALLIS, 2001; PETERSON; LANIEL, 2005). Aproximadamente todas as modificações alteram a carga eletrostática das histonas o que pode levar a mudanças nas suas propriedades estruturais e na sua ligação ao DNA. Além disso, tais modificações podem criar, estabilizar, romper ou ocluir domínios de interação na cromatina com proteínas regulatórias, como fatores de transcrição, proteínas envolvidas na condensação da cromatina e reparo do DNA. Assim, representam a principal categoria de controle transcricional epigenético. Algumas modificações estão associadas a genes ativos, como a acetilação, enquanto outras estão associadas tanto a genes ativos como a genes silenciosos, como a metilação (HUANG et al., 2011; LIZUKA; SMITH, 2003).

Portanto, estas mudanças nas histonas são cruciais para a regulação epigenética. A presença de uma dada modificação pode facilitar ou impedir que uma segunda modificação aconteça; e, elas podem induzir níveis distintos de organização da cromatina. Este código

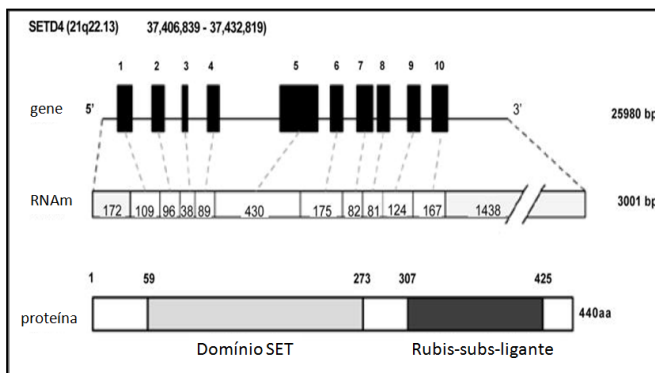
fornece um controle adicional que dita os níveis de expressão gênica, sendo mediado principalmente através de interação proteica. Em combinação com o código do DNA, o código das histonas fornece uma rede sinalizadora de enorme complexidade que permite que a expressão gênica seja modulada (HUANG et al., 2011; JENUWEIN; ALLIS, 2001).

Ainda no contexto das histonas, a metilação de lisina nestas proteínas é catalizada exclusivamente pelas proteínas da família conservada do domínio SET. Entretanto, dados recentes têm revelado que as proteínas contendo o domínio SET podem catalisar a metilação de lisina de proteínas celulares não-histonas também, tais como p53, VEGF, ERα e de NF-κB. (DILLON, 2005; ZHANG; WEN; SHI, 2012). Nesse contexto, muitas lisinas metiltransferases apresentam expressão diferenciada em diversas doenças, incluindo o câncer.

SET domain-containing Protein 4 (SETD4) está localizado na 21q22.13, que transcreve um RNAm de 3001 pb, o que corresponde a uma proteína de 44 kDa que contém 440 aminoácidos. A proteína codificada tem um domínio SET na extremidade N-terminal (59-273) e um domínio ligante Rubis-subs na extremidade C-terminal (307-425) (Figura 3) (FARIA, 2013). No domínio SET, enzimas catalisam a adição de grupos metil de resíduos de lisina em proteínas específicas de histona ou não-histonas (ALBERT; HELIN, 2009; DILLON, 2005). O domínio ligante Rubis-subs, ou domínio de ligação do substrato de Rubisco LSMT, permite a ligação da proteína a um substrato, tal como as caudas N-terminais das histonas e outros alvos (TRIEVEL et al., 2003)

Encontra-se descrito na literatura, que, a proteína humana do domínio SET (SET domain-containing Protein 4 SETD4), está superexpressa em linhagens celulares de câncer de mama ER-negativo (HCC-1954, SKBR-3, MDA-MB-231 e MDA-MB-436); e, superexpressão de SETD4 está envolvida com a proliferação de células de câncer de mama triplo-negativas, MDA-MB-231 (FARIA et al, 2013).

Figura 3 – Representação esquemática das estruturas dos genes e proteínas primárias de SETD4.



Os blocos pretos nos genes e brancos no RNAm representam os exons. Os números acima de cada gene são os números dos exons. Os números dentro dos exons indicam seus tamanhos em nucleotídeos. Linhas finas no gene indicam os íntrons e regiões não traduzidas do primeiro e último exons (mRNA, blocos cinzas). Blocos cinzas e pretos na proteína indicam os domínios SET e Rubis-substância ligante, respectivamente. Fonte: Adaptado de FARIA et al. (2013).

SETD4 está localizado no núcleo e no citosol das células de câncer de mama MDA-MB-231. Já foi demonstrado que o silenciamento da expressão de SETD4 nessa linhagem celular utilizando *short-hairpin* reduziu de maneira drástica a proliferação celular, o que demonstra a importância desse gene como um alvo para terapia para o câncer de mama e contribui para a identificação de novas estratégias no tratamento do câncer de mama triplo negativo (FARIA et al., 2013).

2.1.5 Tratamento do câncer de mama

O prognóstico do câncer de mama depende do estágio da doença. Quando é diagnosticada no início, o tratamento tem maior potencial curativo. Quando há evidências de metástases, o tratamento tem por objetivos principais prolongar a sobrevivência e melhorar a qualidade de vida (BRASIL, 2016b). Em geral, o tratamento contra o câncer é realizado com mais de uma abordagem e está intimamente relacionado com o tipo de câncer e a progressão do tumor (MAIRA et al., 2007).

No câncer de mama, as modalidades de tratamento podem ser divididas em tratamento local, que inclui a cirurgia e radioterapia, bem

como o tratamento sistêmico, envolvendo quimioterapia, hormonioterapia e terapia biológica ou imunoterapia (BRASIL, 2016b). A cirurgia é frequentemente necessária para a remoção do tumor da mama. Opções para esta abordagem incluem a cirurgia conservadora da mama, em que se remove apenas uma parte da mama afetada e a mastectomia, que consiste na remoção total da mama. Embora seja um método invasivo, a retirada física do nódulo é, ainda hoje, a principal forma de controle da progressão da doença (LEE et al., 2012). No entanto, o tratamento com quimioterápicos ou com radioterapia é frequente após a remoção cirúrgica, devido à dificuldade clínica de identificação precisa do limite entre o tumor ou células tumorais presentes no tecido e as células normais, prevenindo complicações, como o desenvolvimento de metástases (MAIRA et al., 2007). Na radioterapia são utilizados feixes de radiação ionizante para eliminar ou reduzir o tumor. Esta radiação danifica o DNA das células tumorais, inibindo a capacidade de dividirem-se e de proliferarem-se. A radiação da mama frequentemente é oferecida após a cirurgia conservadora para ajudar a reduzir a chance de recidivas. A radiação pode também ser recomendada após a mastectomia em pacientes tanto com um tumor maior que 5 cm, ou quando o câncer é encontrado nos gânglios linfáticos (CORN, 2004; AMERICAN CANCER SOCIETY, 2016a).

A quimioterapia, por sua vez, é uma terapia sistêmica em que são utilizados agentes de baixo peso molecular para destruir rapidamente as células em divisão. O mecanismo de ação destes quimioterápicos varia desde a interação com o DNA para bloquear a replicação até a paralisação dos componentes das vias de transdução de sinais (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2016b; MAIRA et al., 2007). Embora a radioterapia e a quimioterapia sejam eficazes, induzindo a morte das células tumorais, podem danificar os tecidos saudáveis e levar a diminuição da qualidade de vida do paciente, bem como a intoxicações mais severas (GUO et al., 2011).

Uma das limitações da quimioterapia consiste no fenômeno de resistência aos agentes quimioterápicos, uma questão importante no tratamento de pacientes com câncer de mama, particularmente aqueles com doença metastática, cujas opções terapêuticas são limitadas. Além disso, a resistência aos atuais agentes quimioterápicos é responsável pelo fracasso do tratamento em mais de 90% dos pacientes com câncer metastático e conseqüentemente ao óbito (LONGLEY; JOHNSTON, 2005). Vários mecanismos pelos quais as células de câncer de mama são, ou tornam-se resistentes a agentes quimioterápicos têm sido descritos, e entre estes mecanismos inclui-se a exclusão ou exportação

ativa do fármaco a partir da célula, o sequestro do fármaco dentro de compartimentos celulares, ativação de enzimas e supressão da apoptose (COLEY, 2009; MICHOR; NOWAK; IWASA, 2006; OSANI et al., 2007; SON et al., 2004).

Outra limitação da quimioterapia é a alta toxicidade dos fármacos, cuja consequência é o aumento da morbidade dos pacientes, levando-os, frequentemente, a óbito antes do término do tratamento (GANZ et al., 2011). Além disso, a quimioterapia convencional baseia-se em excipientes para solubilizar o fármaco, não promovendo a acumulação específica no interior do tumor, para aumentar a biodisponibilidade (BLANCO; FERRARI, 2014; HANAHAN; WEINBERG, 2011;).

A hormonioterapia é outra forma de terapia sistêmica utilizada para o tratamento do câncer de mama que apresenta alta expressão de receptores de estrogênio, também chamados de ER positivo (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2016b). Entre os fármacos mais utilizados está o tamoxifeno, que é amplamente utilizado no Brasil e atua bloqueando os receptores de estrógeno em células de câncer de mama. Este bloqueio interrompe a ligação do estrogênio no receptor e a sinalização para o crescimento e divisão celular (BOSWELL et al., 2012). Finalmente, a terapia biológica ou imunoterapia é um tipo de tratamento mais recente, e vem sendo utilizado, por exemplo, em tumores que expressam o gene HER-2, um fator de crescimento epidérmico (LARSEN; KUMLER; NIELSEN, 2013).

Neste contexto, diversos estudos vêm sendo realizados para otimizar o tratamento do câncer, com o intuito de melhorar os procedimentos terapêuticos convencionais. De fato, a compreensão dos mecanismos genéticos do câncer facilita a identificação dos genes-chave que iniciam e regulam a progressão da doença. Os alvos terapêuticos incluem genes envolvidos nas vias de oncogênese, apoptose, regulação do ciclo e senescência celular, interação tumor-hospedeiro e resistência às terapias convencionais (MASIEIRO et al., 2007).

2.2 RNA DE INTERFERÊNCIA E SHORT INTERFERING RNA

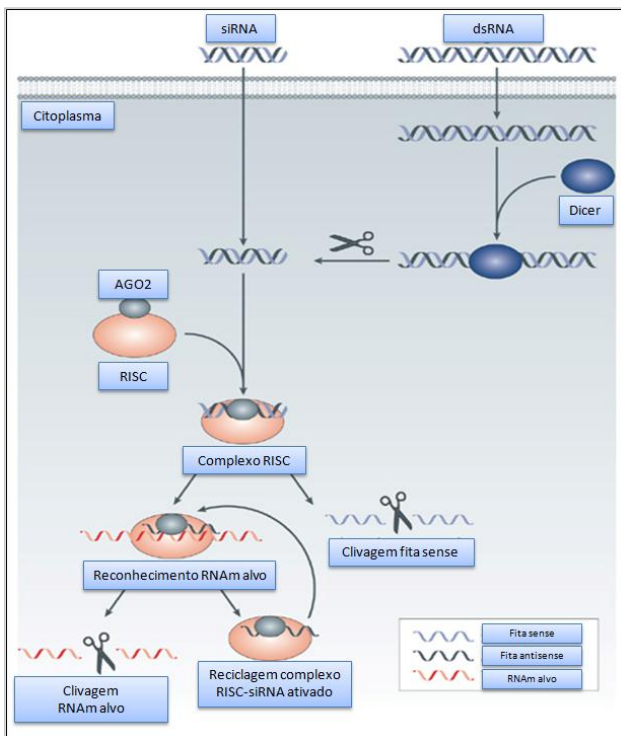
Atualmente, a busca por novos alvos terapêuticos no combate ao câncer de mama envolve a aplicação de moléculas alvo específicas que superem mecanismos de resistência e efeitos colaterais graves da terapia convencional. O conhecimento dos eventos moleculares que levam a formação do tumor, invasão, angiogênese e metástase, abre horizonte

para novas formas de intervenção terapêutica, como a terapia-alvo (ABOU-JAWDE et al., 2003). A lógica deste tratamento prevê que inibidores específicos de proteínas, envolvidas nos mecanismos de sinalização, interfiram na progressão do câncer, alterando o curso natural da doença e evitando danos aos tecidos normais (MAIRA et al., 2007). Neste contexto, a terapia gênica se apresenta como uma boa estratégia e baseia-se na inserção de DNA para o aumento da expressão de genes e proteínas suicidas em células tumorais (WYSOCKI; MACKIEWICZ-WYSOCKA; MACKIEWICZ, 2002).

Entretanto, ao contrário da terapia gênica, que busca aumentar a expressão de genes e produção específica de proteínas, a terapia através do efeito de RNAi prevê a inibição da expressão de genes específicos, e com isso, a redução da produção de proteínas. O efeito de RNAi é um processo fundamental em células eucarióticas, pelo qual sequências evolutivamente conservadas induzem o silenciamento gênico pós-transcricional, através da clivagem de um RNAm ao que são complementares (FIRE et al., 1998). No entanto, a indução de tal efeito também pode ser feita através da inserção de moléculas de RNA sintéticas (KIM et al., 2008; PITTELLA et al., 2012).

Normalmente, a via do RNAi (Figura 3) é desencadeada pela presença de um RNA longo de fita dupla (dsRNA), que é clivado em fragmentos curtos de RNA (os siRNAs) pela enzima Dicer, da família de RNase III. Uma vez presente no citoplasma da célula, é incorporado a um complexo de proteínas denominado RISC (Complexo de Indução de Silenciamento de RNA) (BERNSTEIN et al., 2001; ELBASHIR et al., 2001; OKAMURA et al., 2008). Uma proteína multifuncional desse complexo, Argonauta 2, desenrola o siRNA e a sua fita sense é clivada. O RISC ativado, contendo a fita antisense do siRNA, procura seletivamente e degrada o RNAm alvo que é complementar a sua fita antisense (AMERES; MARTINEZ; SCHROEDER, 2007; MATRANGA et al., 2005; RAND et al., 2004).

Figura 4 – Mecanismo de RNA de interferência.



O mecanismo de ação do siRNA inicia com o RNA longo, de fita dupla, chamado dsRNA (Double Strand RNA), que é clivado por uma enzima denominada DICER, em pequenos RNAs, os siRNAs. Estes, quando no citoplasma da célula, integram-se ao complexo de indução de silenciamento (RISC), que possui uma proteína denominada argonauta 2 (AGO2), a qual desenrola o siRNA e promove a clivagem da sua fita sense. O complexo RISC ativado, contendo a fita antisense do siRNA, procura e degrada o RNAm complementar, levando ao silenciamento gênico. Fonte: Adaptado de Whitehead, Langer e Anderson (2009).

Estudos para a aplicação do efeito de RNA de interferência têm crescido em um ritmo acelerado desde a sua caracterização inicial do fenômeno. Tal efeito foi descrito na década de 90 pela interferência na expressão de genes no nematódeo *Caenorhabditis elegans* (FIRE et al., 1998). Posteriormente, foi demonstrada sua ocorrência em células de mamíferos como pequenos RNAs de fita dupla (siRNAs), de

aproximadamente 21 nucleotídeos, atuando como moléculas efetoras do silenciamento de genes. Assim, desde a elucidação do mecanismo molecular do efeito de interferência, siRNAs emergiram como potenciais agentes terapêuticos, através do silenciamento específico de genes com expressão desregulada em diferentes doenças (ELBASHIR et al., 2001). Essa potencial terapia, chamada terapia por RNAi, tem atraído grande interesse de pesquisadores devido à enorme capacidade de aplicação para o tratamento de doenças, incluindo infecções virais (MORRISSEY et al., 2005; OKUMURA; PITHA; HARTY, 2008) e câncer (KIM et al., 2008; PTASZNIK et al., 2004).

Entretanto, para a aplicação do efeito de RNAi contra genes envolvidos com o desenvolvimento e progressão em câncer de mama, é necessária a utilização de carreadores contendo a sequência do siRNA contra o gene alvo na transfecção das células doentes.

2.2.1 Nanocarreadores para a transfecção de siRNA

Como as moléculas de siRNA estão sujeitas a degradação por enzimas endógenas e são relativamente grandes (~13kDa) e negativamente carregadas, o desenvolvimento de sistemas de liberação seguros e eficientes pode ser um dos fatores mais importantes para efetivar o uso de RNAi na clínica (PITTELLA; KATAOKA, 2013).

Tabela 1 – Principais barreiras para liberação sistêmica de siRNA utilizando nanocarreadores.

Nível	Barreiras
Circulação	Interação com biomacromoléculas e reconhecimento pelo sistema mononuclear fagocitário.
Biodistribuição	Acumulação não específica.
Toxicologia	Toxicidade associada ao nanocarreador; Resposta imune; Saturação do RISC.
Permeabilidade	Penetração no endotélio.
Extracelular	Estabilidade e difusão.
Internalização	Endocitose.
Intracelular	Escape endossomal e dissociação do nanocarreador.

Fonte: Adaptado de Pittella e Kataoka (2013).

Entretanto, mesmo com o uso de nanocarreadores, é necessário superar inúmeras barreiras biológicas de diferentes níveis farmacológicos, para realizar a entrega sistêmica de siRNA, como pode ser observado na Tabela 1.

Os nanocarreadores são classificados como virais e não-virais. Uma partícula viral é constituída de ácido nucleico e algumas proteínas que impedem a sua degradação no ambiente extracelular (GIACCA; ZACCHIGNA, 2012). Um vetor viral constitui um sistema de entrega de alta eficiência, porém as preocupações com segurança, como a citotoxicidade e imunogenicidade, e a dificuldade de produção em larga escala, têm limitado a aplicação deste tipo de vetor, tornando as abordagens não virais mais atraentes.

Assim, pela aplicação da nanotecnologia têm sido desenvolvidos uma série de vetores não-virais para encapsulação de ácidos nucleicos que mimetizam o tamanho e estrutura viral, representando uma alternativa para superar as limitações associadas aos vetores virais, com melhores perfis de eficácia e segurança. Os vetores não-virais, por sua vez, são classificados de acordo com o material utilizado para construí-

los em orgânicos, inorgânicos e híbridos. Assim, a sub-classificação de vetores orgânicos inclui, entre outras, as partículas lipídicas, dendrímeros e micelas poliméricas. Os vetores inorgânicos têm representantes nas partículas metálicas e de cerâmica. Os vetores híbridos consistem em partículas construídas com materiais inorgânicos e orgânicos (TOMANIN; SCARPA, 2004; PITTELLA; KATAOKA, 2013; ZHANG; LI; HUANG; 2014).

Entre os vetores não-virais orgânicos, as partículas lipídicas formam-se a partir da capacidade que certos lipídios têm de se organizar em meio aquoso (TORCHILIN, 2005). Estas podem ser lipossomas, nanopartículas lipídicas sólidas, entre outras. Por sua vez, as partículas poliméricas têm sido amplamente estudadas através da utilização de polímeros biodegradáveis, que podem ser também anfífilos, para formação de micelas, encapsulando materiais para terapia de diferentes doenças (PATIL; PANYAM, 2009). Os dendrímeros são moléculas sintéticas com estrutura bem definida, dividida em três componentes: um núcleo central, uma estrutura dendrítica interior (as ramificações), podendo encapsular ativos para terapia, e uma superfície exterior com um grupo de superfície funcional (NANJWADE et al, 2009).

Em comparação, os vetores não-virais inorgânicos apresentam algumas vantagens em relação aos orgânicos, uma vez que são menos susceptíveis a microrganismos e apresentam excelente estabilidade física (KORNBERG, 1995). Materiais inorgânicos, como fosfato de cálcio (CaP), ouro, nanomateriais de carbono e óxido de ferro, também podem ser empregados como materiais para elaboração de sistemas eficientes de liberação para as células. Neste contexto, as partículas de cerâmica, como as de CaP, consistem em sistemas inorgânicos facilmente sintetizados com tamanho e porosidade adequados (PITTELLA et al., 2011). Tem sido demonstrado que a hibridização do CaP com uma camada neutra e biocompatível do material orgânico poli(etilenoglicol) (PEG) vem sendo considerada, por alguns autores, como uma solução efetiva para a construção de nanocarreadores eficientes (ELSABAHY et al., 2008; KAKIZAWA et al., 2004; KAKIZAWA; KATAOKA, 2002).

2.2.1.1 Fosfato de cálcio (CaP)

O fosfato de cálcio (CaP) consiste em um mineral formado por cátions de cálcio e ânion fosfato. Pode ser encontrado comercialmente em produtos dentários, como pastas de dentes e gomas de mascar

odontológicas (JO et al., 2014; ZHANG; KATAOKA, 2009). Trata-se de um componente inorgânico presente em ossos, dentes e tendões, sendo, portanto, essencialmente biocompatível (ZHANG; KATAOKA, 2009).

Existe uma variedade de formas de CaP, moléculas como hidroxiapatita, fosfato tricálcico, brushite e formas amorfas, que podem ser sintetizadas utilizando diferentes métodos de síntese. Entre elas, a mais comum é a Hidroxiapatita ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$), que é uma forma natural de CaP na proporção molar Ca/P de 1,67 e a configuração mais estável na faixa de pH entre 4,2-12,4. Ela pode ser facilmente sintetizada e tem sido muito estudada como carreador para entrega de oligonucleotídeos (DE LEEUW, 2001; USKOKOVIC; USKOKOVIC, 2011; WHITE; DONG, 2003).

A estabilidade do fosfato é afetada por mudanças na composição, bem como pelas variações no pH e as condições de reação, como solvente, temperatura, pressão, natureza dos precursores e os agentes de complexação, usados para controlar a cinética da reação (KUMTA et al., 2005).

Inúmeras rotas de processamento têm sido desenvolvidas para sintetizar hidroxiapatitas na escala nanométrica HAp. As mais comuns incluem precipitação, reação de estado sólido, métodos de sol-gel, rota hidrotermal, emulsão e técnicas microemulsionadas, entre outras (SADAT-SHOJAI et al., 2013).

O método de precipitação ocorre através da mistura de duas soluções, uma solução contendo cálcio e uma contendo fosfato. A formação de partículas de CaP por este método ocorre primeiramente com a nucleação homogênea, seguida da agregação de partículas primárias de CaP amorfo em unidades esféricas e agregação de esferas em estruturas de cadeia. O crescimento destas estruturas então ocorre, seguido da precipitação secundária e uma fase de transformação. As partículas inicialmente precipitadas têm tamanho de 20-30 nm (embora possam atingir cerca de 120 nm de tamanho), mas compostas de pequenas partículas de 4 nm de tamanho, em média. A menos que sejam estabilizados por aditivos, os cristais de CaP continuam a crescer através de agregação (BLUMENTHAL; POSNER; BETTS, 1980).

A transfecção de DNA viral em células de mamíferos utilizando CaP foi realizada pela primeira vez na década de 70 (GRAHAM; VAN DER EB, 1973). A transfecção ocorre devido à capacidade do DNA viral de complexar ácidos nucleicos/poliânions. Porém, uma das maiores limitações do uso desta metodologia é o crescimento rápido e desorganizado dos cristais após a preparação, resultando na formação de

aglomerados e reduzindo a eficiência da transfecção (KAKIZAWA; KATAOKA, 2002; MAITRA, 2005).

A mistura simples de soluções de fosfato de cálcio, oligonucleotídeos e copolímeros em bloco de poli(etilenoglicol)- bloco-poli(ácido aspártico) (PEG-PAA) em condições estequiométricas, resultaram em nanopartículas formadas por auto-associação, como demonstrado por Kakizawa e Kataoka (2002). Este estudo demonstrou que a copolimerização de PEG e PAA foi essencial para evitar a precipitação de cristais de fosfato de cálcio e permitir a formação das nanopartículas. Diante desta comprovação, diversos estudos têm usado o PEG copolimerizado a poliânions para a estabilização de cristais de CaP (KAKIZAWA; FURUKAWA; KATAOKA, 2004; KAKIZAWA; KATAOKA, 2002; PITTELLA et al., 2011). O efeito protetor do PEG deve-se a formação de uma camada densa e hidratada de cadeias longas e flexíveis na superfície da nanopartícula (JORALEMON; MCRAE; EMRICK, 2010). Além de estabilizar o crescimento do cristal de CaP, o revestimento com PEG melhora a estabilidade biológica das partículas e diminui interações não específicas com biomacromoléculas no sangue (MIYATA; CHRISTIE; KATAOKA, 2011; MOGHIMI; HUNTER; MURRAY, 2001). Tais características influem diretamente na farmacocinética, favorecendo a acumulação das nanopartículas em tumores sólidos através do efeito de aumento da permeabilidade e retenção (EPR - Enhanced Permeability and Retention) (MATSUMURA; MAEDA, 1986), que demonstra vantagens para aplicações *in vivo*.

2.2.1.2 Polímeros sintéticos

Um polímero consiste em um composto químico ou uma mistura de compostos, formados por uma reação de polimerização que compreende essencialmente unidades estruturais (monômeros) repetidas. Apresenta alto peso molecular, sendo derivado da adição de várias moléculas pequenas, como o polietileno, ou da condensação de muitas moléculas menores, com a eliminação de água, álcool, como o nylon. (GOOCH, 2011). Desde a descoberta do processo de polimerização, a síntese de polímeros deixou de ser apenas um fenômeno natural e o estudo dos polímeros naturais e principalmente sintéticos evoluiu rapidamente (DUNCAN, 2003).

A química moderna vem produzindo estruturas de polímeros cada vez mais complexas, incluindo polímeros multivalentes, ramificados, blocos de copolímero, entre outros. Blocos de dois ou mais monômeros

repetidos na mesma cadeia polimérica podem resultar em uma molécula contendo regiões com afinidades opostas por um solvente. Esses blocos de copolímero anfífilos têm a capacidade de formar micelas em solventes específicos e podem ser usados como nanocarreadores de diferentes compostos (KATAOKA; HARADA; NAGASAKI, 2001).

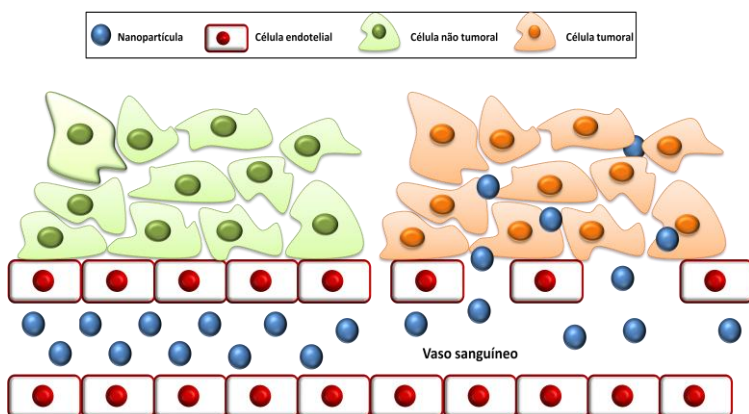
Assim, muitos copolímeros em bloco podem ser sintetizados com diversas funções, tais como responsividade à mudança do pH intracelular e à temperatura, habilidade em atingir tecidos específicos, entre outras. Alguns dos polímeros funcionais podem ser utilizados com o intuito de formar micelas para a incorporação de ácidos nucleicos ou podem, ainda, ser utilizados como um componente em outros sistemas, por exemplo, sistemas de entrega híbridos (BAE et al., 2003; KOHORI et al., 1999; PITTELLA et al., 2011).

2.2.2 Acumulação passiva nas células e tecidos alvos

Partículas em tamanho nanométrico possuem inúmeras vantagens, como a capacidade de atuar como agentes de entrega de fármacos, além de protegê-los contra a degradação biológica, direcioná-los para o alvo de interesse e promover sua liberação controlada. Porém, uma vez que algumas nanopartículas apresentam circulação prolongada e são removidas pelo fígado, elas possuem dificuldades em atingir seu sítio alvo. Assim, a diferença da natureza intrínseca das células endoteliais na região tumoral, comparada a não tumoral, promove o acúmulo das nanopartículas no tumor (KOZLOVA; EPPLE, 2013).

As células tumorais dividem-se rapidamente e requerem um fornecimento contínuo de nutrientes para manter a proliferação. Estas células, portanto, secretam fatores de crescimento que induzem a angiogênese e resultam numa rápida e desordenada neovascularização em torno da área do tumor. Os novos capilares sanguíneos presentes formam junções interendoteliais que permitem maior permeabilidade ao tecido extravascular. Através desta vasculatura com vazamento no tumor, algumas substâncias, incluindo nanopartículas, são capazes de extravasar a partir dos vasos sanguíneos para o tecido tumoral. Além disso, o desenvolvimento do sistema linfático é insuficiente neste tecido, resultando em pobre drenagem de substâncias macromoleculares. Esta acumulação de macromoléculas preferencialmente em tecidos de tumores sólidos é conhecida como efeito de permeabilidade e retenção aumentada, EPR (Figura 5). O efeito EPR tornou-se o guia para direcionamento passivo em câncer (MAEDA, 2010; MATSUMURA; MAEDA, 1986).

Figura 5 – Representação esquemática da acumulação passiva das nanopartículas no tumor, devido ao efeito EPR.



No tumor, a angiogênese ocorre de maneira rápida e desorganizada, levando a formação de espaços entre as células endoteliais, o que favorece a passagem das nanopartículas dos vasos sanguíneos para as células tumorais. Fonte: Adaptado de NAM et al. (2013).

2.2.3 Estado atual em ensaios clínicos de terapia por siRNA

Desde o primeiro ensaio de terapia gênica humana realizada em 1989, mais de 1340 ensaios clínicos utilizando esta terapia já estão em fase final, em andamento e dois foram aprovados em todo o mundo (KANASTY et al., 2013; ROSENBERG et al., 1990).

Considerando a terapia de RNAi, muito esforço e investimento foram realizados para incluir a terapia por siRNA no mercado e poucos programas estão realizando desenvolvimento clínico, nos últimos anos. Entretanto, alguns fármacos à base de RNAi já entraram em ensaios clínicos (Tabela 2), e muitos estão em desenvolvimento. Destes, a maioria inclui a entrega local/tópica nos olhos e pele; enquanto outros estão relacionados com a distribuição sistêmica no fígado e rins. A entrega local do siRNA tem a vantagem de que, como para qualquer fármaco, a dose de siRNA necessária para a eficácia é substancialmente inferior quando comparado a administração sistêmica. A entrega direta também pode reduzir os efeitos colaterais indesejáveis. A administração sistêmica de siRNA para atingir tecidos profundos continua sendo um desafio, embora alguns sucessos recentes em modelos animais e alguns

estudos em humanos tenham surgido (DEVINCENZO et al., 2008; VAISHNAW et al., 2010).

A descoberta dos mecanismos de RNA de interferência em células humanas é relativamente recente, mas, apesar disso, rapidamente verificou-se que o uso de RNAi como ferramenta também pode ser feito *in vivo*, diretamente em animais. Obviamente, a maior parte desses testes pré-clínicos têm sido feitos em camundongos, mas animais maiores, como macacos, também são usados, com resultados promissores. Isso estimulou o desenvolvimento de estudos diretamente em humanos e vários protocolos clínicos já estão sendo testados (FOUGEROLLES et al., 2007).

O primeiro relato de RNAi em seres humanos utilizando siRNA sintético entregue de forma sistêmica foi publicado em 2010 (DAVIS et al., 2010). Neste trabalho, a redução dos níveis de mRNA da subunidade M2 de ribonucleótido-redutase (RRM2) e da proteína RRM2 foi observada, após a administração de nanopartículas contendo siRNA para RRM2 em pacientes com tumores sólidos. Este é o primeiro ensaio clínico em desenvolvimento, utilizando um sistema de entrega de nanopartículas para siRNA que demonstra que RNAi pode ocorrer em um ser humano, a partir de um siRNA entregue sistemicamente.

O desenvolvimento de terapias baseadas em RNAi tornou-se um campo de pesquisa atrativo e promissor sobretudo nos casos em que a inibição de determinadas proteínas não teve sucesso pelos métodos farmacológicos tradicionais. Além disso, o desenvolvimento de siRNA é extremamente simples em relação ao tradicional *drug design*, no qual há necessidade de conhecimento da estrutura cristalográfica da proteína-alvo, o que não é garantia de sucesso em determinar os ligantes ativos nessas estruturas. Apesar de existirem casos nos quais siRNAs podem atuar em alvos diferentes do previsto (efeito conhecido como *off-target*), vários protocolos experimentais têm demonstrado a especificidade dada pela sequência dessas moléculas, o que estimula novas pesquisas na área (HANNON, 2002)

Tabela 2 – Alguns sistemas de liberação à base de RNAi em ensaios clínicos.

continua

Molécula	Alvo	Sistema de entrega	Situação (estágio clínico)	Doença
ALN-VSPO2	KSP e VEGF	LNP	Concluído (Fase I)	Tumores sólidos
siRNA-EphA2-DOPC	EphA2	LNP	Recrutamento (Fase I)	Câncer avançado
Atu027	PKN3	LNP	Concluído (Fase I)	Tumores sólidos
TKM-080301	PLK1	LNP	Recrutamento (Fase I)	Câncer
TKM-100201	VP24,VP35,Zaire Ebola L-polimerase	LNP	Recrutamento (Fase I)	Infecção por vírus Ebola
ALN-RSV01	RSV nucleocapsídeo	<i>Naked</i> siRNA	Concluído (Fase II)	Infecções de vírus sinciciais respiratórios
PRO-040201	ApoB	LNP	Finalizado (Fase I)	Hipercolesterolemia
ALN-PCS02	PCSK9	LNP	Concluído (Fase I)	Hipercolesterolemia
CALAA-01	RRM2	Ciclodextrina NP	Ativo (Fase I)	Tumores sólidos
TD101	K6a (N171K mutation)	<i>Naked</i> siRNA	Concluído (Fase I)	Paquioníquia congênita
AGN211745	VEGFR1	<i>Naked</i> siRNA	Finalizado (Fase II)	Degeneração macular relacionada a idade/ Neovascularização Coróideia
I5NP	p53	<i>Naked</i> siRNA	Concluído (Fase I)	Lesão renal/Insuficiência renal aguda

Tabela 2 – Alguns sistemas de liberação à base de RNAi em ensaios clínicos.
conclusão

Molécula	Alvo	Sistema de entrega	Situação (estágio clínico)	Doença
PF-655	RTP801	Naked siRNA	Ativo (Fase II)	Neovascularização Coroideia/Retinopatia diabética/Edema macular diabético
siG12D LODER	KRAS	LODER polímero	Recrutamento (Fase II)	Câncer pancreático
Bevasiranib	VEGF	Naked siRNA	Concluído (Fase II)	Edema macular diabético/Degeneração macular
CEQ508	CTNNB1	Escherichia carreando shRNA	Recrutamento (Fase I e II)	Polipose adenomatosa familiar
RXi-109	CTGF	Auto-entrega RNAi	Recrutamento (Fase I)	Prevenção de cicatriz

DPC, Policonjugados dinâmicos; LNP, nanopartícula lipídica; NP, nanopartícula; shRNA, short hairpin RNA. Fonte: Adaptado de Kanasty et al. (2013).

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver e avaliar novas nanopartículas para a entrega de siRNA complementar aos genes AKT3 e SETD4 às células de câncer de mama.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Construir sequências efetivas e específicas de siRNA complementar a AKT3 e SETD4;
- Preparar nanopartículas híbridas de PEG-poliânion/siRNA/CaP;
- Caracterizar as nanopartículas quanto à distribuição de tamanho médio, potencial zeta e morfologia;
- Determinar a eficiência de incorporação de siRNA pelas nanopartículas;
- Avaliar a estabilidade coloidal das nanopartículas;
- Avaliar a internalização celular das nanopartículas híbridas;
- Avaliar a atividade citotóxica dos siRNAs de AKT3 e SETD4 incorporados nas nanopartículas híbridas em células de câncer de mama;
- Verificar a eficiência do silenciamento na expressão dos genes AKT3 e SETD4 pelos siRNAs entregues pelas nanopartículas híbridas em células de câncer de mama, em concentrações sub-tóxicas.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MATERIAIS

TRIZol® foi adquirido da Life Technologies®; fosfato de sódio tribásico e cloreto de cálcio (CaCl_2) foram adquiridos da Nuclear; ácido etilenodiaminotetraacético (EDTA), cloreto de magnésio (MgCl_2), bicarbonato de sódio (NaHCO_3), dextrose foram adquiridos da Reagen (Rio de Janeiro, Brasil); etanol, metanol e clorofórmio foram adquiridos da Merck® (Alemanha); álcool isopropílico da Lafan Química Fina (Várzea, SP, Brasil); hidróxido de sódio (NaOH), tripsina, soro fetal bovino (SFB), penicilina e estreptomicina foram adquiridos da Cultilab (Campinas, SP, Brasil); meio de cultura Dulbecco's modified eagle's medium (DMEM); dimetil sulfóxido (DMSO); azul de tripano, brometo de dimetiazoldifeniltetrazólio (MTT), paraformaldeído; glutaraldeído; ácido N-[2-Hidroxietil] piperazina-N'-[2-etanosulfônico] (HEPES), 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) e as sequências de iniciadores (primers) para RT-PCR e de siRNA foram adquiridos da Sigma-Aldrich® e LysotrackerGreen DND-26 da Thermo Scientific®. O polímero foi adquirido da Alamanda Polymers, Inc.® (Huntsville, AL, EUA). Tris(hidroximetil)aminometano (TRIS) foi adquirido da Synth (Diadema, SP, Brasil).

4.2 CONSTRUÇÃO DAS SEQUÊNCIAS DE siRNA TERAPÊUTICO

Neste trabalho, foi usada a ferramenta Whitehead siRNA Selection Server disponível no site <http://sirna.wi.mit.edu/home.php> para o desenho dos siRNAs contra os genes AKT3 e SETD4. Este programa oferece flexibilidade na definição dos padrões de sequências de siRNA. Diferentes propriedades dos siRNAs foram calculadas, incluindo valores termodinâmicos, polimorfismos e os resultados são mostrados após o Basic Local Alignment Search Tool (BLAST). Todas as sequências foram sintetizadas por Sigma-Aldrich Brasil.

4.3 PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE NANOCARREADORES

4.3.1 Preparação das nanopartículas híbridas PEG-poliânion/siRNA/CaP

Nanopartículas híbridas compostas por poli(etileno glicol)-bloco-poliânion, CaP e siRNA foram precipitadas através de mistura simples e estequiométrica de soluções aquosas contendo cloreto de cálcio e fosfato trissódico na presença de siRNA e PEG-poliânion, em capela de fluxo laminar, para garantir esterilidade, como descrito em Pittella et al (2012), com modificações.

Inicialmente, foram preparadas soluções de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 2,5 M (PM=147,02 g/mol); solução tampão TRIS 10 mM pH 10 (PM=121,14 g/mol); solução tampão TRIS-HCl 10 mM pH 7,4; solução tampão HEPES 10 mM pH 7,4 (PM=238,30 g/mol) e uma solução HEPES-fosfato pH 7,4 contendo HEPES 50 mM, $\text{Na}_3\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 1,5 mM e NaCl 140 mM (PM Na_3PO_4 =380,12 g/mol e PM NaCl=58,45 g/mol). O polímero PEG-poliânion (5K-50DP) foi diluído na solução tampão TRIS-HCl para concentração de 1000 $\mu\text{g/mL}$. Sequências de siRNA foram diluídas em solução tampão HEPES 10 mM pH 7,4 na concentração de 15 μM .

Após uma triagem com diferentes proporções e concentrações de cálcio e polímero, as nanopartículas foram precipitadas através da seguinte mistura simples e estequiométrica: soluções aquosas de cloreto de cálcio são misturadas em tampão TRIS pH 10 e siRNA para formar a solução 1. Em outro frasco, são misturados tampão HEPES-fosfato e solução de PEG-poliânion (1000 $\mu\text{g/mL}$), para formar a solução 2. Ambas as soluções são misturadas vigorosamente com pipeta, por aproximadamente 20 segundos (concentração final de siRNA: 2,25 μM). A partir de interações eletrostáticas, os componentes se auto-associam (*self-assemble*) para a complexação do siRNA.

4.3.2 Determinação da forma, tamanho médio, distribuição de tamanho e concentração das nanopartículas híbridas.

4.3.2.1 Avaliação do diâmetro hidrodinâmico e distribuição de tamanho das nanopartículas híbridas por DLS

Para a determinação do diâmetro hidrodinâmico médio e a distribuição de tamanho das nanopartículas híbridas, medidas de

espalhamento dinâmico de luz DLS (Dynamic Light Scattering) foram realizadas usando um Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Worcestershire, UK). As medidas foram realizadas com um laser He-Ne (633 nm) como feixe incidente em ângulo de detecção de 173°, e uma cubeta de quartzo (ZEN2112). Os dados obtidos a partir da velocidade de decaimento da função de correlação de fótons foram analisados para obter os diâmetros hidrodinâmicos e correspondentes índices de polidispersão (PDI) (μ/Γ^2) das nanopartículas. As medidas foram feitas a 25°C após a preparação das nanopartículas e também após ressuspensão em meio de cultura DMEM com e sem soro fetal bovino.

4.3.2.2 Avaliação da morfologia, tamanho e distribuição de tamanho das nanopartículas híbridas por TEM

A fim de avaliar a morfologia das nanopartículas, observações no TEM (Microscopia Eletrônica de Transmissão) foram realizadas no Laboratório Central de Microscopia Eletrônica da UFSC utilizando o equipamento JEM-1011 TEM (Jeol Ltd., Tokyo, Japan) operado em voltagem de aceleração de 80kV. A amostra foi depositada em grids de níquel malha 200 (CF200-Ni, EMS) revestidos com Parlodion® e carbono amorfo e seca por 24 horas a temperatura ambiente. Para a análise da morfologia, operou-se o TEM em modo de campo brilhante com uma ampliação de até 50,000×. Para a determinação da frequência de distribuição de tamanho, foram analisadas pelo menos 500 nanopartículas nas imagens de microscopia usando o software ImageJ.

4.3.2.3 Determinação da concentração das nanopartículas híbridas por NTA

Para determinar a concentração de nanopartículas híbridas em suspensão, foi utilizada a técnica de Nanoparticle Tracking Analysis (NTA), através do equipamento NanoSight NS300 (Malvern Instruments, Worcestershire, UK), a qual combina microscopia de espalhamento de luz a laser com uma câmara acoplada, que permite a visualização e a gravação das nanopartículas em suspensão. Nessa técnica, um feixe de laser passa através da câmara de amostras e as partículas em suspensão no caminho deste feixe dispersam a luz, permitindo a visualização dos cones de difração das partículas por ampliação de 20× em microscópio, sobre a qual é acoplada a câmara, operando em 30 frames por segundo (fps), capturando em um arquivo

de vídeo as partículas que se encontram em movimento browniano. O software segue muitas partículas individualmente e usando a equação de Stokes-Einstein calcula os seus diâmetros hidrodinâmicos (MALVERN, 2016a).

A amostra foi diluída em água 1×10^4 vezes e injetada usando uma seringa de 1 mL. As nanopartículas foram analisadas em câmera sCMOS, nível 14. O limite de detecção para todas as amostras foi de 5. Um vídeo de 10 segundos foi obtido com 1498 frames. Os resultados foram analisados no NTA software 3.1.

4.3.3 Determinação da carga superficial das nanopartículas híbridas

A determinação do potencial zeta foi realizada no equipamento Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Worcestershire, UK) com uma cubeta específica (DTS 1060), com um potencial estabelecido de ± 150 mV. A carga de superfície das partículas foi estimada por medidas de mobilidade eletroforética, em que as partículas movem-se na presença do campo elétrico em direção ao eletrodo de carga oposta e, desta forma, o potencial zeta é calculado através da medida da sua velocidade de migração usando a equação de Smoluchowski, através do Zetasizer Software versão 7.03 (MALVERN, 2016b).

4.3.4 Análise de composição elementar do sistema carreador

Para identificação dos átomos presentes na superfície (composição) das nanopartículas híbridas PEG-poliânion/CaP/siRNA foram utilizadas as técnicas de Espectroscopia de Emissão de Fotoelétrons Excitados por raios X e Espectroscopia de raios X por dispersão em energia.

4.3.4.1 Espectroscopia de emissão de fotoelétrons excitados por raios X (XPS)

A Espectroscopia de Emissão de Fotoelétrons Excitados por raios X (XPS) foi realizada com um espectrômetro Thermo Scientific ESCALAB 250xi. Esta técnica permite a obtenção da composição elementar, o estado químico e eletrônico dos elementos presentes na superfície das amostras (IVANOV, 2011; IVANOV; BEDNAR; HAES, 2009).

Para a análise, um ânodo de Al (radiação monocromática $K\alpha$ - energia de 1486.6 eV e uma largura de linha típica de 0,83 eV) foi

usado para análise. Para as medições, filmes foram preparados com uma gota das nanopartículas purificadas para serem depositadas em suportes de silício limpos e, em seguida, secas ao ar. A pressão na câmara do espectrômetro foi de 7×10^{-9} mbar. As energias de passagem (*pass energy*) do analisador foram 100 e 25 eV no modo *survey* e no modo *scan* de alta resolução, respectivamente. O possível carregamento da amostra foi corrigido assumindo uma energia de ligação constante de 285 eV para o pico relativo ao orbital C 1s do carbono adventício. Todos os picos foram ajustados usando curvas de Gauss-Lorentz (GL30) após a remoção de elétrons de fundo, utilizando o método de Shirley.

4.3.4.2 Espectroscopia de raios X por dispersão em energia (EDS)

A análise de EDS foi realizada utilizando a nanopartícula híbrida após purificação, para uma concentração de cálcio final de 0,294 mM (425 vezes menor que a inicial) através da interface YPSZ-porcelana usando um detector de silício Oxford Instruments® X-max montado na câmara de FIB-SEM (Tescan Lyra-3 XM) (Oxford, UK).

Na otimização da intensidade do feixe para reduzir o ruído na tensão de aceleração de 5.0 kV, foi realizado o mapeamento em duas ampliações diferentes (com tamanhos de imagem de 2048×2048 pixels) em toda região.

4.3.5 Eficiência de incorporação do siRNA

Para estabelecer a eficiência de incorporação, as nanopartículas PEG-poliânion/CaP/siRNA foram centrifugadas a $47.800 \times g$ por 30 minutos, para precipitação das nanopartículas complexadas com siRNA, utilizando a centrífuga Thermo Scientific Sorvall Evolution RC. O sobrenadante, contendo siRNA livre, foi cuidadosamente coletado e analisado por eletroforese em gel de agarose, com o marcador azul de bromofenol.

Adicionalmente, para determinar a quantidade de siRNA não incorporado, o kit Quanti-iT miRNA assays (Thermo Scientific®) foi utilizado. De acordo com o protocolo do kit, a intensidade de fluorescência aumenta linearmente à medida que o reagente fluorescente presente intercala com as bases do siRNA. Para obtenção da curva de calibração, foram preparadas soluções de siRNA em tampão HEPES pH 7.4 em concentrações de 0; 0,25; 0,50; 1,00 e 1,25 μ M. Primeiramente, foi preparada a solução de trabalho (reagente:tampão 1:200 v/v) e

pipetados 100 µl da mesma em placa para leitura de fluorescência, seguido de 5 µl dos padrões de siRNA em diferentes concentrações e do sobrenadante coletado. A fluorescência foi avaliada em espectrofluorímetro (PerkinElmer® LS55, USA) com comprimentos de onda de excitação/emissão máximas em 500/525 nm. A partir das medidas de fluorescência dos padrões, obteve-se a equação da reta que possibilitou a quantificação de siRNA nos sobrenadantes coletados. A porcentagem de siRNA incorporada foi calculada através da fórmula:

$$E. I\% = \frac{(\text{concentração obtida no sobrenadante})}{(\text{concentração teórica inicial})} \times 100$$

4.3.6 Avaliação da estabilidade do sistema carreador

A estabilidade do sistema carreador em condições de armazenamento a 4°, 20°C e temperatura ambiente, diluição em meio salino e secagem por liofilização foi avaliada por DLS.

4.3.6.1 Estudo da estabilidade coloidal em condições normais de armazenamento

A estabilidade coloidal do sistema carreador foi avaliada em termos de aspecto macroscópico, distribuição de tamanho, índice de polidispersão e potencial zeta. Amostras dos sistemas nanoestruturados PEG-poliânion/siRNA/CaP foram estocadas a temperatura ambiente, a 4 °C e a -20 °C. Em diferentes tempos (especificados em cada experimento), alíquotas das formulações foram retiradas e avaliadas por DLS. O potencial zeta das nanopartículas híbridas foi avaliado para as amostras armazenadas a 4 °C.

4.3.6.2 Estudo preliminar da secagem por liofilização

Para a preparação das amostras a serem liofilizadas, 3 mL das nanopartículas sem siRNA (Mock) foram transferidos para um frasco com capacidade máxima de 10 mL e adicionado uma solução de dextrose, com concentração final de 10% (p/p) (PM 180,16) como crioprotetor. Em outro frasco repetiu-se o procedimento, porém sem a adição do açúcar. Posteriormente, as amostras foram congeladas a -20°C por 12 h, seguido de liofilização por 24h em Liofilizador LD 1500 (Terroni Ltda., SP, Brasil), sob pressão de 872 mmHg e temperatura de

condensação de -46°C . Logo após, o pó resultante foi ressuspensão com pipeta em água ultrapura e a leitura de tamanho foi realizada por DLS e potencial zeta, como descrito no tópico 4.3.3.1.

4.3.6.3 Estabilidade em condições salinas

A distribuição de tamanho das nanopartículas híbridas PEG-poliânion/siRNA/CaP foi avaliada após adição de meio de cultura. Medidas de DLS foram realizadas a 25°C usando um Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Worcestershire, UK) antes e após a adição de meio DMEM, com ou sem SFB, observando-se mudanças no tamanho de distribuição e índice de polidispersão (PdI).

4.3.7 Purificação das nanopartículas híbridas

A suspensão de nanopartículas contendo 30 μg de siRNA e 500 μg PEG-poliânion (0,5 mL) foi purificada e concentrada por ultrafiltração utilizando um dispositivo de Vivaspin-500 (peso molecular de cut-off (MWCO): 5 kDa) (Sigma Aldrich®). A centrifugação foi realizada em um rotor fixo a $15,000\times g$ a 4°C durante 30 min. Para minimizar a ligação não específica das nanopartículas híbridas na membrana, o filtro do dispositivo foi lavado com água deionizada antes da sua utilização. Com este processo, o excesso de íons foi removido pela passagem através do filtro, e as nanopartículas acima do cut-off foram retidas. Após centrifugação, a suspensão retida (0,05 mL) foi transferida para um eppendorf e o tamanho e o índice de Polidispersão (PdI) das nanopartículas purificadas foram avaliados por DLS, como descrito no tópico 4.3.3.

4.4 CITOTOXICIDADE E SILENCIAMENTO DA EXPRESSÃO GÊNICA *IN VITRO* INDUZIDA POR siRNA CARREADO EM NANOPARTÍCULAS HÍBRIDAS PEG-POLIÂNION/siRNA/ CaP

4.4.1 Cultura celular

A linhagem celular de câncer de mama triplo negativa utilizada nos experimentos foi a MDA-MB-231 (ATCC® HTB-26) e a linhagem não tumoral foi a NIH-3T3 (ATCC® CRL-1658™), obtidas do Banco de Células do Rio de Janeiro. As células foram mantidas em garrafas plásticas para cultura celular contendo o meio de cultura DMEM suplementado com 10%(v/v) de SFB inativado, 100 U/mL de

penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina e 10 mM de tampão de HEPES, pH 7.2, em estufa úmida a 37°C, com 5% CO₂. As células foram semeadas a uma densidade de $1,0 \times 10^6$ células/garrafa e repicadas a cada 48 a 72 horas em fluxo laminar. No início de cada experimento, a suspensão celular foi centrifugada a $200 \times g$, por 10 minutos em temperatura ambiente (20 a 25°C). O sobrenadante foi descartado e o sedimento celular ressuspensão em 1 mL de meio de cultura DMEM. O número de células viáveis foi, então, avaliado pelo método de exclusão do corante Azul de Trypan (0,5%) (FRESHNEY, 1987) e foram utilizadas para os experimentos somente culturas com viabilidade celular superior a 95%.

4.4.2 Viabilidade celular

O potencial efeito antitumoral das nanopartículas PEGpoliânion/ siAKT3/CaP e PEGpoliânion/siSETD4/CaP, sobre as células de linhagem de câncer de mama (MDA-MB-231) e linhagem não tumoral NIH-3T3, foi avaliado pelo método do MTT. Trata-se de um método colorimétrico baseado na redução do sal MTT (brometo de dimetiazol difeniltetrazólio) ao seu derivado formazan, de cor roxa, pelo metabolismo mitocondrial (VAN DE LOOSDRECHT et al., 1991).

As células foram semeadas em 100 µL de DMEM contendo 10% SFB em uma placa de 96 poços (5×10^3 células/poço) e incubadas por 24 horas. As nanopartículas, contendo 1, 10, 100 e 1000 nM de siRNA, foram adicionadas com meio fresco com 10% SFB e a viabilidade celular avaliada após 48, 72 e 96 horas para a célula MDA-MB-231 e 72h para NIH-3T3. Utilizou-se como controles negativos nanopartículas vazias (*Mock*), ou seja, sem siRNA, siRNA (100 nM) sem a nanopartícula (*Nacked*), e por fim, nanopartículas contendo siRNA *scramble* (10 e 100 nM), o qual não possui homologia com sequência de genes conhecida. Após o tempo de incubação de cada experimento, o sobrenadante foi removido e adicionou-se ao meio de cultura 10% (v/v) de solução de MTT (5 mg/mL em PBS). Após 3h de incubação a 37°C, o sobrenadante foi novamente removido. Os precipitados formados em cada poço foram dissolvidos em 100 µL de DMSO. Cada poço foi medido pela leitura da absorbância a 540 nm, em um leitor de placas Microwell Systems (Organon Teknika, Belgium). Os resultados foram expressos como porcentagem (%) em relação às células controle, incubadas apenas com meio de cultura.

4.4.3 PCR quantitativo

As células MDA-MB-231 foram semeadas em 2 mL de DMEM contendo 10% SFB em uma placa de 6 poços (1x10⁵ células/poço). Após 24 horas, as nanopartículas foram adicionadas com meio fresco em concentração subtóxica de siRNA. Utilizaram-se como controles negativos células controle apenas com meio de cultura, siRNA *naked* (100 nM) e nanopartículas contendo siRNA *scramble* (100 nM). Em seguida, as células foram coletadas após nova incubação por 24 horas para AKT3 e 48h para SETD4 e o RNA total foi extraído usando TRIzol (Gibco®) (Grand Island, NY, EUA). A quantidade de RNA extraído foi medida e padronizada após a eliminação do DNA genômico para a síntese de cDNA (High Capacity cDNA reverse transcription kit, Life Technologies). RT-PCR em tempo real foi realizado usando o StepOnePlus Real-time RT-PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA) e Power SYBR Green qPCR Master Mix (Thermo Scientific Inc, San Jose, CA, USA), nas condições descritas no Quadro 1 . A expressão gênica foi normalizada pela beta-actina humana como um gene constitutivo antes da análise estatística. A sequência do primer foi CCAACCGCGAGAAGATGA (Beta-Actina forward) e CCAGAGGCGTACAGGGATAG (Beta-Actina reverse).

A sequência de primers (5’-3’) utilizada para demonstração de eficiência foi GCCCTCACGATAATCAACGG (SETD4 forward) e TCCAACCTCTTGAGACATAAACAC (SETD4 reverse) e CTCTATTATTTGGGCTGAGTCATCA (AKT3 forward) e GGGTTTGGATTCTCTGCTGC (AKT3 reverse). A curva de eficiência dos mesmos está descrita no apêndice C.

Quadro 1 – Condições da reação de qPCR para os genes AKT3 e SETD4.

			40 ciclos			Curva de dissociação			
Tempo	2’	15’	15’’	30’’	38’’	15’’	1’	15’’	∞
T (°C)	50	95	94	57	72	95	60	95	4

4.4.4 Observação da internalização celular das nanopartículas híbridas por Microscopia Confocal

Células MDA-MB-231 foram cultivadas em placas com base de vidro (Grainer Bio-one, Alemanha) em 2 mL de DMEM contendo 10%

de soro fetal na densidade de 1×10^5 células/poço. Após 24 horas incubadas a 37 °C e 5% CO₂, o meio de cultura foi removido, adicionando-se a suspensão de nanopartículas, encapsulando um siRNA marcado com cianina 5 ou seu respectivo controle (siRNA não encapsulado marcado com cianina 5), ao abrigo da luz. Em seguida, procedeu-se a marcação do endossomo/lisossomo com o corante LysoTrackerGreen na concentração de 50 nM com uma incubação de 60 minutos a 37 °C e 5% CO₂. As células foram lavadas 3 vezes com PBS 1× e fixadas com paraformaldeído 4% e glutaraldeído 2,5% por 15 minutos a 4°C. O excesso de corante foi retirado e foi adicionado a sonda DAPI na concentração de 1µg/mL por 10 minutos ao abrigo da luz, para identificação das células. As células foram lavadas 3 vezes com PBS. As imagens de microscopia confocal foram obtidas utilizando um microscópio confocal Leica DMI6000 B (Leica Microsystems®) com óleo de imersão e objetiva de 63×. O comprimento de onda para excitação é 488 nm (laser de Ar) ou 633 nm (laser de He-Ne), e 710 nm (laser Mai Tai, operado em modo de dois-fotons).

A quantificação e a taxa de co-localização foram realizadas através do software do equipamento.

4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise de variância (ANOVA) foi realizada para testar os efeitos dos tratamentos e teste de Tukey usado para comparações múltiplas entre os grupos de tratamento individuais, utilizando o software GraphPad Prisma 6.0 (GraphPad Software, Inc.). A significância estatística é representada como *p <0,05, **p<0,01 e ***p <0,001. A menos que indicado, todos os experimentos foram realizados em triplicata e, os resultados apresentados, expressos como valores médios (± Erro Padrão da Média).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 SELEÇÃO DOS GENES ALVO E SEQUENCIAS DE siRNA

Os genes alvos AKT3 e SETD4 foram selecionados através de revisão da literatura e análise das respectivas posições como proteína-chave em cascata intracelular efetora. Os candidatos escolhidos foram identificados como reguladores da proliferação celular, sobrevivência, crescimento, motilidade e angiogênese, sendo determinados como bons alvos moleculares no câncer de mama. As sequências dos subtipos dos genes e dados adicionais como posição no cromossomo, éxons e íntrons, polimorfismo e conservação entre espécies, foram obtidas através do banco de dados público do Genoma Humano no site “NCBI Genes and Expressions” em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/>.

PI3K participa de inúmeras vias de transdução de sinais envolvidas em respostas celulares. A cascata de sinalização PI3K-AKT3 regula a iniciação, progressão e invasão celular pela inibição da senescência e apoptose, induzindo cascatas de sobrevivência das células (CARNERO, 2010). Nesse contexto, um estudo utilizou siRNAs para todas as isoformas de AKT em células de câncer de próstata e o silenciamento desses genes inibiu o crescimento das células *in vitro* (SASAKI et al., 2010). Outro trabalho, desenvolvido por CHIN et al. (2013), utilizando short hairpin RNA (shRNA), demonstrou que o silenciamento do gene AKT3 inibe o crescimento de células de câncer de mama triplo negativas, principalmente da linhagem MDA-MB-231.

Em relação ao gene SETD4, o primeiro e único estudo sobre sua caracterização e atuação na carcinogênese foi realizado por Faria et al (2013). Nele, o silenciamento de SETD4 utilizando short-hairpin está associado com a diminuição da proliferação da linhagem de câncer de mama MDA-MB-231, tornando esse gene um alvo interessante para o tratamento do câncer de mama triplo negativo.

Os estudos com a utilização de siRNAs vêm sendo explorados tanto para a pesquisa de agentes terapêuticos, quanto para a investigação da função dos genes (DYKXHOORN; PALLISER; LIEBERMAN, 2006; ECHEVERRI; PERRIMON, 2006). Como nem todos os siRNAs complementares aos RNAm específicos são eficazes, têm sido desenvolvidas ferramentas computacionais para aumentar a probabilidade de se selecionar siRNAs efetivos e também evitar o efeito em outros RNAm, que não o de interesse (HUESKEN et al, 2005; REYNOLDS et al, 2004; SAETROM; SNOVE, 2004). Ao utilizar a

ferramenta computacional, foram considerados critérios que devem ser seguidos para a seleção da melhor sequência de siRNA (REYNOLDS et al., 2004; YUAN et al., 2004), como:

- Localização em 50 a 100 nucleotídeos do códon inicial (ATG); sequência padrão AA (N19) TT ou NA (N21), ou NAR (N17)YNN, [onde N é qualquer nucleotídeo, R representa purina (A, G) e Y é pirimidina (C, U)]; uma vez que estes padrões mostraram-se mais efetivos no efeito de RNAi;

- A sequência deve apresentar um teor de guanina e citosina entre 30-52%; pois um baixo teor desestabiliza a dupla fita de siRNA, enquanto que um elevado conteúdo impede a ligação ao RISC;

- Evitar trechos de quatro ou mais repetições de nucleotídeos, para não haver a formação de estruturas secundárias;

- Evitar sequências que partilham certo grau de homologia com outros genes, para aumentar a especificidade.

Além desses critérios, a ligação do siRNA ao complexo RISC (favorecendo a fita antisense) foi considerada para aumentar a probabilidade de se desenhar siRNAs eficazes. Os estudos mostram que é a fita antisense que se liga ao RISC para o processo de silenciamento e a fita sense é clivada. Como uma diferença de energia de ligação (fita sense e antisense) positiva favorece a ligação da fita sense ao RISC, esta foi evitada (KHVOROVA; REYNOLDS; JAYASENA, 2003; SCHWARZ et.al, 2003).

Baseando-se nos critérios acima apresentados, as sequências de siRNA complementares ao RNAm de AKT3 foram desenhadas: 5'-CUA UCU ACA UUC CGG AAA G dTdT-3' (fita sense) e 3'-dTdT GAU AGA UGU AAG GCC UU UC-5' (fita antisense). Para SETD4 foram utilizadas 5'- GGA AUA CGG AUU UGU UU dTdT CU-3' (fita sense) e 3'- dTdT CCU UAU GCC UAA ACA AA GA- 5' (fita antisense).

5.2 AUTOMONTAGEM E CARACTERIZAÇÃO DA NANOPARTÍCULA HÍBRIDA PEG-POLIÂNION/siRNA/CaP

Os cristais de CaP preparados por auto-associação possuem a propriedade de complexar de forma eficiente os ácidos nucleicos. No entanto, a precipitação por via úmida de íons fosfato e cálcio resulta em agregados de cristais em escala microscópica, o que limita o seu uso em sistemas biológicos (KAKIZAWA; KATAOKA, 2002). Por esta razão, o copolímero PEG-poliânion foi utilizado a fim de estabilizar o crescimento do cristal de CaP na escala nanométrica, melhorar a estabilidade biológica das partículas e diminuir interações não

específicas com biomacromoléculas no sangue. Além disso, esses blocos de copolímero são facilmente preparados, dispersíveis em água e estáveis em ambientes biológicos (MOGHIMI; HUNTER; MURRAY, 2001; MIYATA; CHRISTIE; KATAOKA, 2011).

As nanopartículas híbridas têm como componentes orgânicos e inorgânicos, o fosfato de cálcio e o polímero, respectivamente. O polímero consiste em um copolímero em bloco hidrofílico, no qual um dos blocos tem carga negativa e outro bloco, PEG, possui caráter não-iônico.

Desta forma, as nanopartículas foram precipitadas através de mistura simples e estequiométrica de soluções aquosas contendo CaCl_2 em tampão Tris pH10 na presença de siRNA e PEG-poliânion em tampão HEPES-fosfato pH 7,4. O sistema foi formado por auto-associação dos componentes, sendo produzido de maneira rápida e fácil.

Nas medidas de DLS, as nanopartículas apresentaram uma distribuição estreita no histograma de intensidade com diâmetro hidrodinâmico médio em zetasizer de 53 ± 4 d.nm e PDI de $0,09 \pm 0,02$ na formulação testada (FIGURA 6A). De forma similar, nas imagens de TEM (Figura 6B e C) foram observadas nanopartículas com forma arredondada relativamente homogênea, com tamanho médio de 47 ± 18 nm.

Analizando o histograma da frequência de distribuição de tamanho das nanopartículas determinado por TEM e DLS (Figura 6D), observa-se que os resultados obtidos por TEM estão bem correlacionadas com a medida de tamanho por DLS. A pequena diferença encontrada pode ser explicada pelas características inerentes a cada técnica. Uma vez que a camada externa de PEG apresenta baixa densidade eletrônica, sua visualização é prejudicada no TEM. Desta forma, o tamanho medido com esta técnica é relativamente menor. Por outro lado, a técnica de DLS é baseada no espalhamento de luz para a aferição do tamanho, compreendendo também os dados da camada externa de PEG para o cálculo do diâmetro. Além disso, foi utilizado para comparação com o TEM o histograma de intensidade por DLS, uma vez que se trata de uma nanopartícula híbrida, e; portanto, não há índice de refração e viscosidade da amostra para avaliar o histograma de número.

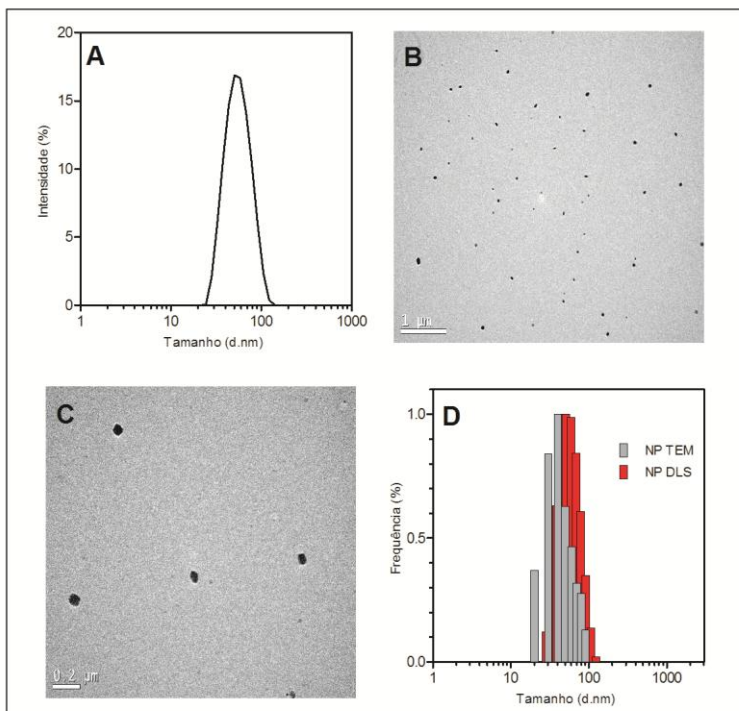
A técnica de preparação de nanopartículas de PEG-poliânion/CaP para a transfecção de siRNA e DNA foi desenvolvida em 2004 por um grupo de pesquisadores no Japão (KAKIZAWA et al, 2004). O crescimento de cristais de fosfato de cálcio foi controlado pelo uso de um bloco de copolímero poli(etileno glicol) - bloco - poli aspartato

(PEG-PAsp) para estabilizar o agregado. O uso deste polímero em condições estequiométricas de íons possibilitou a obtenção de nanopartículas com revestimento e tamanho apropriado para aplicações médicas, corroborando os resultados encontrados neste trabalho.

O tamanho de partícula obtido e o polímero hidrofílico utilizado para revestimento podem evitar o reconhecimento pelo sistema imune e levar ao extravasamento das partículas do sangue para os tecidos tumorais e inflamatórios, através do efeito EPR, quando aplicado *in vivo*, o que resulta na acumulação do siRNA no local alvo. Além disso, partículas grandes o suficiente (acima de 20 nm) podem evitar o processo de filtração renal. (KAKIZAWA; FURUKAWA; KATAOKA, 2004; ALLEN, 2004).

Para a determinação da carga superficial das nanopartículas utilizou-se a técnica de mobilidade eletroforética. A suspensão de nanopartículas apresentou carga superficial de $0,25 \pm 0,22$ mV, resultado próximo da neutralidade, indicando a presença de PEG na superfície da nanopartícula. Devido ao caráter não iônico deste polímero, a estabilização das nanopartículas deve-se ao mecanismo estérico, diferindo da estabilização por cargas de sistemas distintos (SHI, 2002). Cargas superficiais próximas a zero são entendidas como vantajosas para aplicação *in vivo*, uma vez que diminuem substancialmente a interação com macromoléculas circulantes (VERMA; STELLACCI, 2010).

Figura 6 – Caracterização das nanopartículas híbridas.



(A) Tamanho das nanopartículas híbridas através do histograma de intensidade determinado por medida de DLS. (B) e (C) Imagens da morfologia das nanopartículas híbridas obtidas por TEM, com tamanho da barra de 1 μm e 0,2 μm , respectivamente. (D) Histograma da frequência de distribuição de tamanho das nanopartículas determinado por TEM (cinza) e DLS (vermelho).

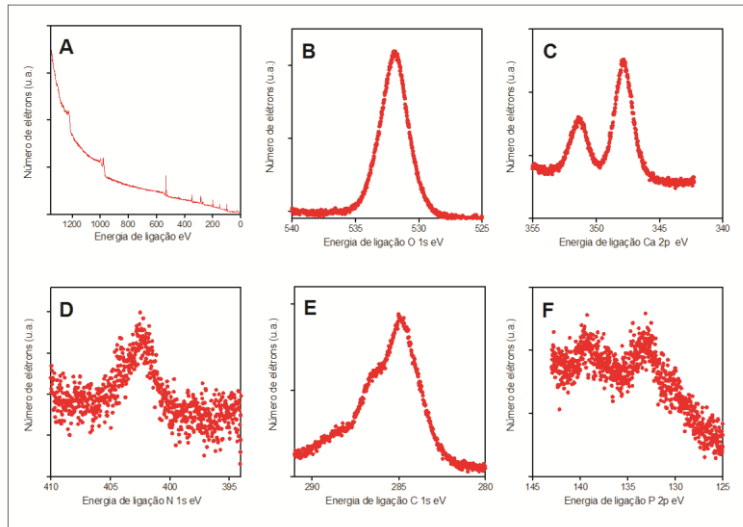
5.3 ESPECTROSCOPIA DE EMISSÃO DE FOTOELÉTRONS EXCITADOS POR RAIOS X (XPS)

A espectroscopia de emissão de fotoelétrons excitados por raios X (XPS), realizada no Centro Brasileiro de Pesquisas Físicas, foi usada como uma técnica adicional para identificar a composição química da superfície da nanopartícula híbrida PEG-Poliânion/siRNA/CaP.

Esta técnica é baseada na incidência de fótons de raios X na amostra, os quais interagem com os elétrons do material, ocorrendo a transferência de energia. Esses elétrons, ao atingirem a superfície da amostra, são capazes de abandoná-la para um ambiente externo, como uma câmara de vácuo. Os elétrons ejetados da amostra podem ser coletados por um analisador de elétrons, obtendo-se o espectro de XPS, no qual, a estrutura de bandas é individual e diferente para cada elemento químico (BIESINGER et al., 2011; WAGNER et al, 2016).

A Figura 7 mostra o espectro na faixa de energia de ligação de 0 até 1400 eV de um filme de nanopartículas purificadas, depositadas em um suporte de silício. Como esperado, foram encontrados picos relativos ao oxigênio, em que o pico característico do envelope O1s foi observado em 532,02 eV; cálcio (347,98 eV e 351,38 eV); nitrogênio (402,54 eV); carbono (284,88 eV) e fósforo (133,12 eV e 139,52 eV). Tais resultados indicam a presença dos elementos cálcio, nitrogênio, carbono e fósforo, sugerindo a presença do revestimento de CaP e polímero nas nanopartículas.

Figura 7 – Espectro de fotoemissão das nanopartículas híbridas.



Espectros XPS dos sistemas nanocarreadores. A. O espectro de fotoemissão na faixa de energia de ligação de 0-1400 eV. B. Envelope do orbital 1s do O. C. Envelope do orbital 2p do Ca. D. Envelope do

orbital 1s do N. E. Envelope do orbital 1s do C. F. Envelope do orbital 2p do P.

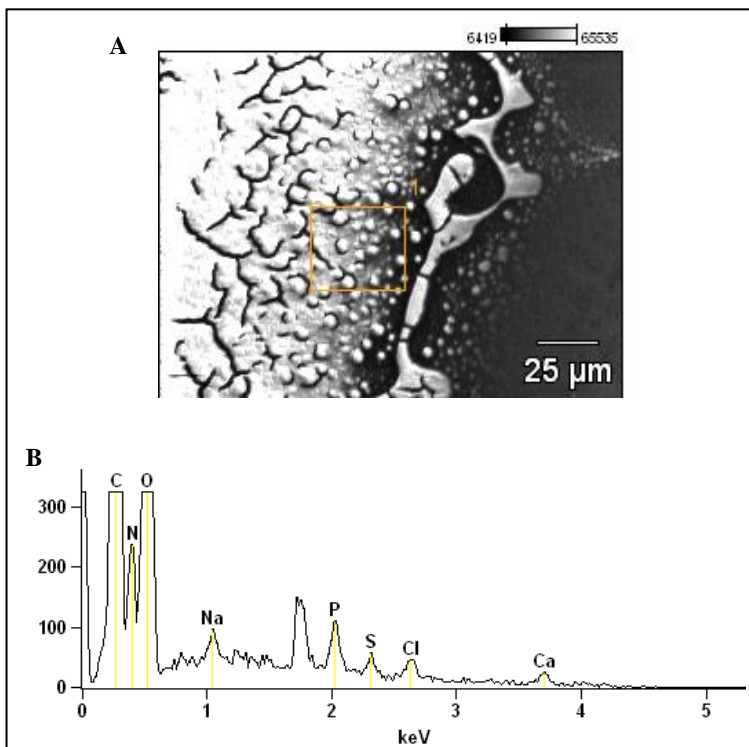
5.4 ESPECTROSCOPIA DE RAIOS X POR DISPERSÃO EM ENERGIA (EDS)

Outra técnica utilizada para confirmar os elementos químicos presentes nas nanopartículas em estudo foi a Espectroscopia de raios X por dispersão em energia (EDS).

O Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV) é um equipamento capaz de produzir imagens de alta ampliação e resolução e o que se visualiza no monitor do aparelho é a transcodificação da energia emitida pelos elétrons. Já no EDS, quando o feixe de elétrons incide sobre o material, os elétrons mais externos dos átomos são excitados, mudando de níveis energéticos. Ao retornarem para sua posição inicial, liberam a energia adquirida, a qual é emitida em comprimento de onda no espectro de raios-X. Um detector instalado na câmara de vácuo do MEV mede a energia associada aos elétrons. Como os elétrons de um determinado átomo possuem energias distintas, é possível, no ponto de incidência do feixe, determinar quais elementos químicos estão presentes naquele local e assim identificar em instantes que mineral está sendo observado (LYMAN et al., 1990).

Os elementos carbono, oxigênio, nitrogênio, fósforo, cálcio, sódio, enxofre e cloro foram identificados no espectro de EDS (Figura 8).

Figura 8 – Espectro de EDS das nanopartículas híbridas.

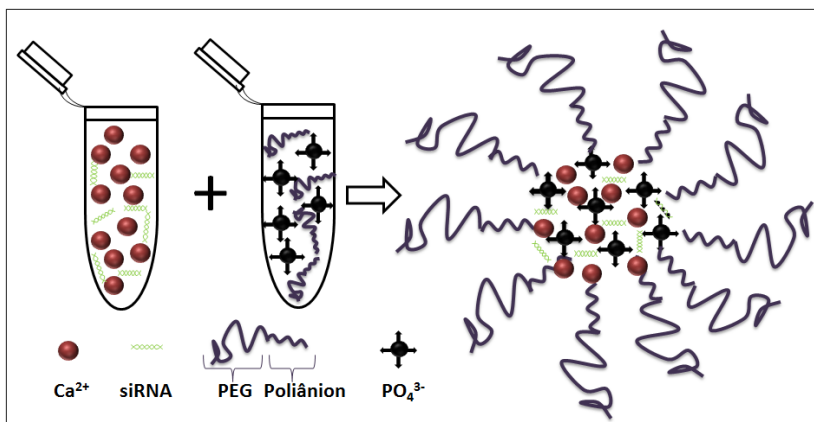


Imagens de microscopia eletrônica de varredura (A) e Espectroscopia de Energia Dispersiva (B) da nanopartícula híbrida.

Utilizando a análise por EDS, foi possível caracterizar a amostra através de interações entre radiação eletromagnética e matéria, analisando os raios X emitidos pela matéria em resposta à incidência de partículas carregadas. Como cada elemento tem uma estrutura atômica única, os raios X emitidos são característicos de cada estrutura, que identificam o elemento (LYMAN et al., 1990). Portanto, a presença dos elementos cálcio, fósforo, nitrogênio e carbono indicam a presença do CaP e polímero, corroborando os resultados obtidos por XPS. Assim, com as técnicas até aqui utilizadas para a caracterização das nanopartículas, foi possível prever uma possível estrutura do sistema nanoparticulado (Figura 9).

Também foram detectados os elementos sódio, enxofre e cloro, que podem indicar a presença dos tampões utilizados na preparação das nanopartículas que permaneceram em solução mesmo após a purificação.

Figura 9 – Representação esquemática do processo de incorporação de ácidos nucleicos ao sistema nanoparticulado.



A estrutura das nanopartículas híbridas foi sugerida através das técnicas de caracterização das nanopartículas híbridas. As imagens por TEM indicam a forma arredondada das partículas; as técnicas de XPS e EDS identificaram a presença dos elementos cálcio, fósforo, nitrogênio, oxigênio e carbono, os quais interagem de maneira eletrostática; e a carga superficial neutra permite sugerir o posicionamento do PEG na superfície das partículas.

5.5 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS HÍBRIDAS

A concentração da amostra pode afetar o desempenho do produto ou a resposta biológica de um vetor de entrega de fármacos; por esta razão, evidencia-se a necessidade de metodologias para medir concentração de partículas. Há definições que estipulam que uma amostra contendo 50% ou mais de partículas por uma distribuição de tamanho por número, com um tamanho menor que 100 nm, é identificada como um nanomaterial. Além disso, medir a concentração de partículas é importante para sistemas carreadores, em que a resposta biológica pode ser influenciada pelo tamanho e concentração de partículas do vetor de entrega (EC, 2011).

Através da técnica de NTA foi possível obter a concentração de partículas por mL produzidas por precipitação em condições estequiométricas. Nas condições utilizadas, obteve-se $1,72 \times 10^{12}$ partículas/mL de suspensão.

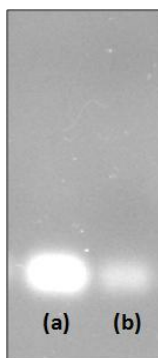
Com esta técnica, também foi possível observar as partículas como pontos de luz em movimento Browniano. Neste caso, a velocidade de uma partícula é diretamente proporcional ao seu tamanho (Apêndice A) (MALVERN, 2016a).

5.6 EFICIÊNCIA DE INCORPORAÇÃO DO siRNA.

Utilizando um kit de detecção de miRNA, com uma curva padrão de siRNA (Apêndice B), foi possível adaptá-lo para quantificar o siRNA livre na suspensão de nanopartículas e, dessa forma, estimar a porcentagem de siRNA incorporado nas mesmas. A porcentagem de siRNA complexado nas nanopartículas foi de aproximadamente 45% do total adicionado durante a formação das nanopartículas. A imagem obtida por gel de agarose mostra a presença de siRNA no sobrenadante das nanopartículas (Figura 10).

Em relação ao PEG-PAA, já foi demonstrado que a medida que a concentração de polímero aumenta, a quantidade de oligodeoxinucleotídeo incorporado diminuiu substancialmente, sugerindo ser devido à ligação competitiva entre PEG-PAA e oligodeoxinucleotídeos no CaP (KAKIZAWA; FURUKAWA; KATAOKA, 2004). Porém, quanto menor a quantidade de polímero, menos estável tornam-se as nanopartículas e menor a biodisponibilidade na circulação sanguínea dificultando a eficácia *in vivo* (MOGHIMI; HUNTER; MURRAY, 2001; MIYATA; CHRISTIE; KATAOKA, 2011). Desta maneira, foi decidido que uma formulação com 1000 ug/mL de copolímero iniciais, que incorporasse cerca de 50%, fosse suficiente para um efeito *in vitro*, ao mesmo tempo que possuísse efeito superior *in vivo*.

Figura 10 – Eletroforese em gel de agarose.



Separação de siRNA não incorporado nas nanopartículas, onde (a) indica siRNA 15 μ M e (b) o sobrenadante das nanopartículas híbridas contendo siRNA.

5.7 ESTUDO DA ESTABILIDADE COLOIDAL

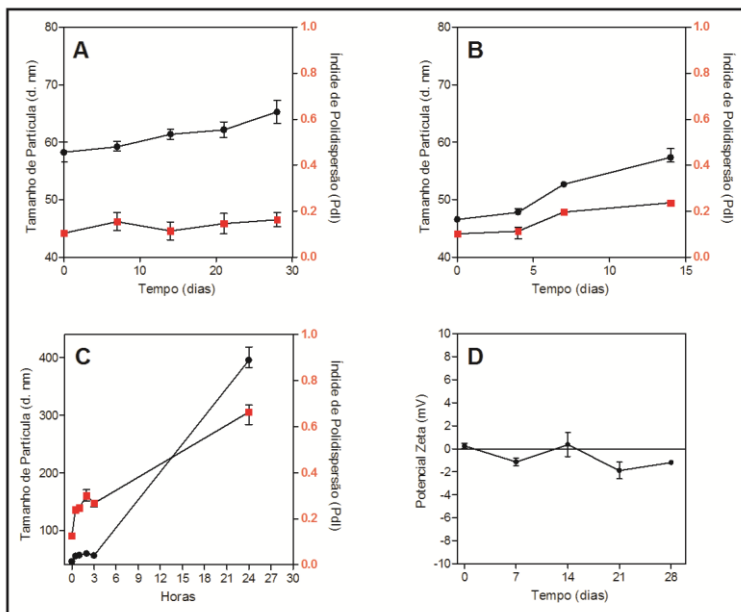
Existem duas interações possíveis entre as moléculas: atração e repulsão. Quando a atração domina, as partículas se aderem e toda a dispersão pode coalescer. Já, quando a repulsão prevalece, o sistema se torna estável e permanece num estado disperso. Portanto, é necessário estabelecer a repulsão entre as partículas, quando carregadas, para conferir estabilidade. Uma outra maneira de conferir estabilidade às partículas é envolvê-las com moléculas poliméricas, promovendo estabilização por impedimento estérico (FRITZ et al., 2002; NAPPER, 1983; SHI, 2002).

Com esta estratégia, o sistema desenvolvido permaneceu estável durante a incubação prolongada a 4°C, por 28 dias, em relação ao tamanho e PdI (Figura 11A) e, também, ao potencial zeta (Figura 11D) e não apresentou mudanças no aspecto macroscópico. Esses resultados indicam que o copolímero PEG-poliânion, que atua como um agente para controlar o tamanho nanométrico, também provê estabilidade coloidal ao sistema.

As nanopartículas híbridas mantiveram-se estáveis por 7 dias quando submetidas ao congelamento/descongelamento (Figura 11B). As nanopartículas não demonstraram estabilidade coloidal por longo período a temperatura ambiente (Figura 11C), indicando a necessidade de armazenamento a uma temperatura menor e estável (4 °C) em

detrimento às variações da temperatura ambiente. Porém, técnicas de secagem nessa condição podem ser estudadas para prevenir a desestabilização causada pela presença de água, como a operação de liofilização (FONTE; REIS; SARMENTO, 2016).

Figura 11 – Mudança no diâmetro relativo e potencial zeta dependente do tempo e temperatura das nanopartículas híbridas



As determinações foram realizadas por DLS. (A) 4 °C, (B) -20°C, (C) 25°C. (D) Estabilidade do sistema nanoparticulado a 4°C por potencial zeta.

5.8 ESTUDO PRELIMINAR DA LIOFILIZAÇÃO DAS FORMULAÇÕES

A liofilização consiste em uma operação de secagem, na qual a água que se encontra no estado sólido, é retirada por sublimação sem ocorrer a passagem pelo estado líquido. É o método de escolha para estabilização de produtos farmacêuticos, pois o produto liofilizado apresenta estabilidade em longo prazo, aspecto físico adequado e é facilmente reconstituído, mantendo as propriedades físico-químicas dos

produtos como tamanho e forma de partícula (FONTE; REIS; SARMENTO, 2016; SRINIVASAN et al., 2015).

No entanto, a liofilização não é sempre efetiva. Esta operação pode gerar agregação das nanopartículas, acarretando na dificuldade de reconstituição dos sólidos formados e perda das propriedades originais do sistema. O uso de crioprotetores, como os açúcares dextrose, frutose, trealose entre outros, pode diminuir os efeitos indesejados do processo de liofilização como agregação, liberação do conteúdo incorporado, separação de fases, alteração de pH e osmolaridade, entre outros (ABDELWAHED; DEGOBERT; FESSI, 2006; MEHNERT; MADER, 2001; YUE et al., 2015).

Para avaliação da estabilidade das nanopartículas sem siRNA (Mock) após liofilização, foi verificado se houve variação de tamanho, PDI e potencial zeta. Na Tabela 3, apresentam-se as medidas de DLS e potencial zeta para as amostras com ou sem adição do crioprotetor. Observou-se que o processo de liofilização não alterou o tamanho, o PDI e o potencial zeta das nanopartículas sem crioprotetor e que o uso de dextrose como crioprotetor nas concentrações avaliadas não foi eficaz, alterando parcialmente as propriedades das partículas. O resultado indica que não foi necessária a adição de crioprotetores para a liofilização, uma vez que a camada externa de PEG foi capaz de proteger o núcleo da nanopartícula dos estresses do processo de liofilização. Porém, outros estudos são necessários para avaliar o efeito da liofilização. Utilizar diferentes tipos e concentrações de crioprotetores e determinar a taxa de incorporação após liofilização também é importante para avaliar a secagem por liofilização.

Tabela 3 – Medidas de DLS e potencial zeta após liofilização.

	Mock antes da liofilização	Mock antes da liofilização + 10% dextrose	Mock após a liofilização e reconstituição	Mock +10% dextrose após liofilização e reconstituição
Tamanho (d.nm)	63,30±0,52	73,47±0,03	71,91±0,96	90,76±5,56
PDI	0,246±0,007	0,256±0,007	0,266±0,033	0,466±0,062
Potencial zeta (mV)	-1,27±0,80	-0,39±0,40	-1,34±0,39	-1,25± 0,20

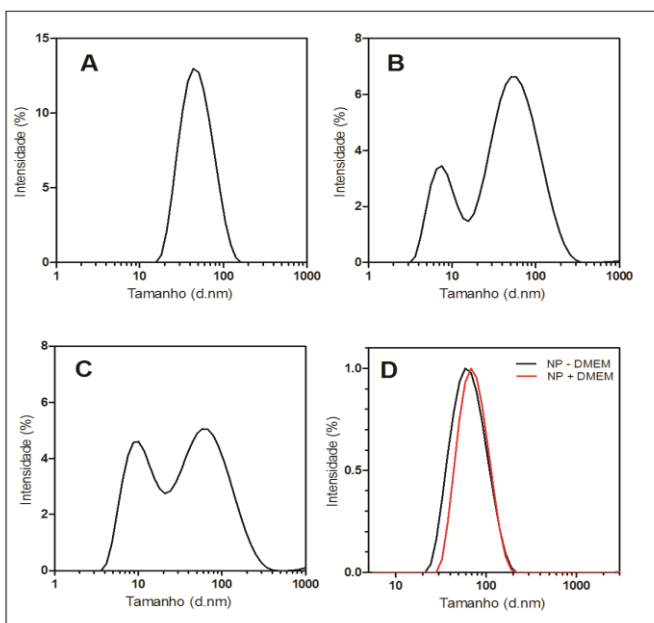
5.9 DETERMINAÇÃO DO TAMANHO DE DISTRIBUIÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS HÍBRIDAS APÓS ADIÇÃO DE MEIO DE CULTURA

Para os estudos *in vitro*, as nanopartículas são adicionadas nas células com meio de cultura DMEM, portanto, torna-se importante caracterizá-las após adição deste meio.

É possível observar na figura 12D que a amostra manteve praticamente o mesmo tamanho e PDI, mesmo após a adição de DMEM sem SFB. A suspensão não se manteve igual em relação a distribuição de tamanho, depois da adição de meio de cultura DMEM com SFB (Figura 12B). Porém, a partir da leitura apenas do meio de cultura DMEM com SFB (Figura 12 C), é possível observar que o meio com soro dificulta a visualização exata do tamanho das nanopartículas. Portanto, os componentes do soro, como proteínas, podem comprometer as medidas por DLS.

Portanto, este resultado sugere que as nanopartículas são estáveis quando diluídas em meio de cultura em concentração de siRNA semelhantes aquelas usadas nos ensaios *in vitro*.

Figura 12 – Tamanho das nanopartículas híbridas através do histograma determinado por medida de DLS.



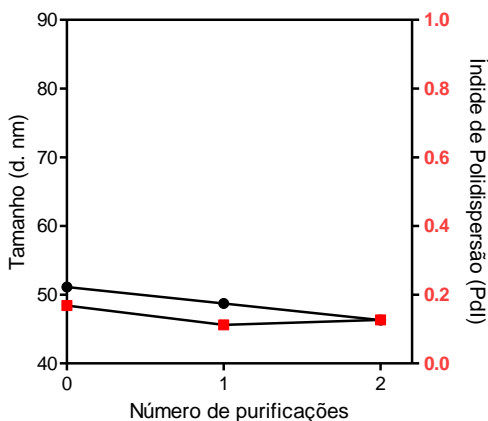
Medidas de DLS de (A) NP PEG-Poliânion/CaP/siRNA (B) NP PEG-Poliânion/CaP/siRNA após adição de meio de cultura DMEM com SFB (C) DMEM com SFB (D) NP PEG-Poliânion/CaP/siRNA antes da adição de meio de cultura DMEM sem SFB (linha preta) e após a adição do meio de cultura DMEM sem SFB (linha vermelha).

5.10 PURIFICAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS HÍBRIDAS

A purificação das nanopartículas híbridas é realizada para remoção do excesso de íons cálcio livres. Tal remoção é essencial para a administração sistêmica da formulação, pois íons cálcio em excesso podem induzir efeitos adversos na corrente sanguínea e em tecidos, como bradicardia, arritmias e fibrilação ventricular (PITTELLA et al., 2012; WINKLER; HOFF; SMITH, 1940). Assim, as suspensões de nanopartículas foram purificadas por ultrafiltração, e então, caracterizadas em termos de tamanho e PdI. Mesmo após duas centrifugações, as nanopartículas purificadas mantiveram uma

distribuição de tamanho por intensidade estreita, semelhante às não purificadas (Figura 13).

Figura 13 – Caracterização por DLS das nanopartículas híbridas após processo de purificação.



Medidas de DLS após purificação. O eixo X representa o número de purificações. O eixo Y esquerdo, o diâmetro hidrodinâmico da partícula em nm (preto) e o eixo Y direito, o índice de polidispersão (PdI) (vermelho).

5.11 VIABILIDADE CELULAR

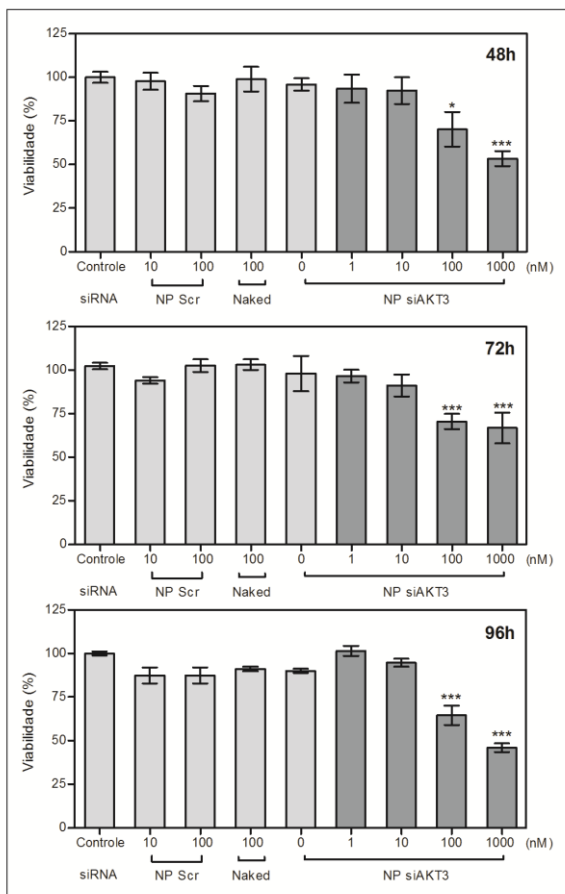
A determinação de possível citotoxicidade foi realizada através do ensaio por MTT. A linhagem celular humana de adenocarcinoma mamário MDA-MB-231 foi escolhida por ser amplamente utilizada como modelo de câncer de mama para avaliação de novas terapias (BRIANE, 2012; GHAFARI, 2014; CHEN et al., 2015).

Na Figura 14, o tratamento das células MDA-MB-231 com siRNA para o gene AKT3 causou a diminuição do número de células viáveis de maneira dependente de concentração e tempo de incubação. A redução significativa do número de células viáveis em 48, 72 e 96h foi observada a partir da concentração de 100 nM, enquanto que o siRNA na mesma concentração, sem nanopartícula (*naked*) não alterou a viabilidade celular, o que demonstra a eficiência do sistema de entrega desenvolvido. Assim, esta concentração foi selecionada para o estudo do silenciamento gênico.

Estudos demonstram que o silenciamento do gene AKT3 inibe a proliferação de células de câncer de mama triplo-negativas em ensaios *in vitro* e xenográficos, o que pode ser explicado pelo fato deste gene atuar na regulação da proliferação e crescimento do tumor (CHIN et al., 2014).

Os resultados mais significativos foram obtidos em 72h e 96h. O início do silenciamento, o nível e a sua duração são influenciados por diversos fatores, incluindo tipo de célula, tempo de duplicação e concentração de siRNA. Além disso, as transfecções podem ser realizadas de maneira repetida, para manter o efeito de RNAi (DYKXHOORN; NOVINA; SHARP, 2003).

Figura 14 – Viabilidade celular, após incubação com nanocarreadores NP PEG-poliânion/siAKT3/CaP em células de câncer de mama MDA-MB-231.



Avaliação da viabilidade celular em células MDA-MB 231. Eixo X: 1ª coluna representa o controle: células não tratadas; 2ª coluna, NP siSCRAMBLE 10nM; 3ª coluna, NP siSCRAMBLE 100nM, 4ª coluna, Naked siAKT3 100nM; 5ª coluna, Mock: nanopartícula branca; 6ª, 7ª, 8ª, 9ª colunas, NP siAKT3: nanopartícula contendo siAKT3 em diferentes concentrações (1, 10, 100 e 1000nM respectivamente) e eixo Y indica a viabilidade celular (%), em que (A) representa o tratamento em 48h, (B) 72h e (C) 96h. Os controles foram definidos como 100% de viabilidade. * $p < 0,05$ em comparação ao controle, *** $p < 0,001$ (ANOVA seguido de Tukey).

Na Figura 15, o tratamento das células MDA-MB-231 com siRNA para o gene alvo SETD4, o qual encontra-se superexpresso nesta linhagem, também causou a diminuição do número de células viáveis de maneira dependente de concentração e de tempo de incubação.

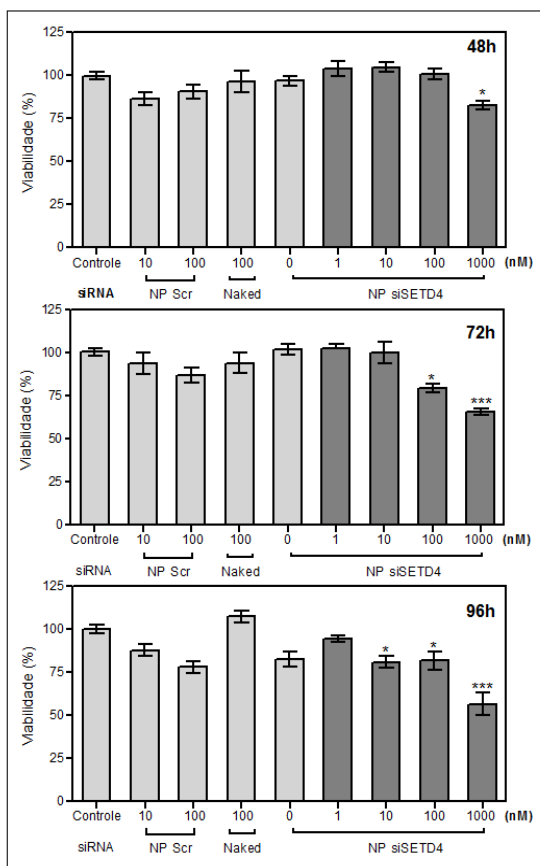
Outro trabalho demonstra que o silenciamento de SETD4 nesta mesma linhagem suprimiu significativamente o metabolismo do MTT e reduziu drasticamente a capacidade de formação de colônias das células. Portanto, o estudo do gene SETD4 é importante e pode contribuir para a identificação de novas estratégias para o tratamento de tumores de mama triplo negativos (FARIA et al., 2013).

A redução da viabilidade foi observada a partir da concentração de 100nM em 72h e 10nM em 96h, quando utilizam-se as nanopartículas híbridas para entrega do siRNA. A concentração de 100nM entregue sem o sistema nanoparticulado também não diminui a viabilidade celular, podendo indicar a degradação intracelular do siRNA, que não atinge o citoplasma da célula, onde ocorre o efeito de RNAi, bem como o silenciamento do gene SETD4 com as nanopartículas híbridas.

Logo, é provável que as nanopartículas híbridas foram eficientes na transfecção desta linhagem celular de câncer de mama e, as sequências de siRNA desenhadas promoveram o silenciamento gênico.

Adicionalmente, e não menos importante, os controles negativos não diminuíram a viabilidade celular; indicando, portanto, que o sistema nanoparticulado aqui apresentado tem baixa ou nenhuma citotoxicidade *per se*. Estudos demonstram que muitas nanopartículas apresentam toxicidade, sendo necessária a troca de meio ou adição de outros materiais para reduzir os efeitos tóxicos, o que pode acarretar no aumento do custo final. Como exemplo, Li et al (2010) utilizaram moléculas lipídicas para formar um lipossomo de revestimento de cristais de CaP. Porém, para diminuir a toxicidade *in vivo* os pesquisadores tiveram que realizar um passo de pós-revestimento do nanocarreador com PEG.

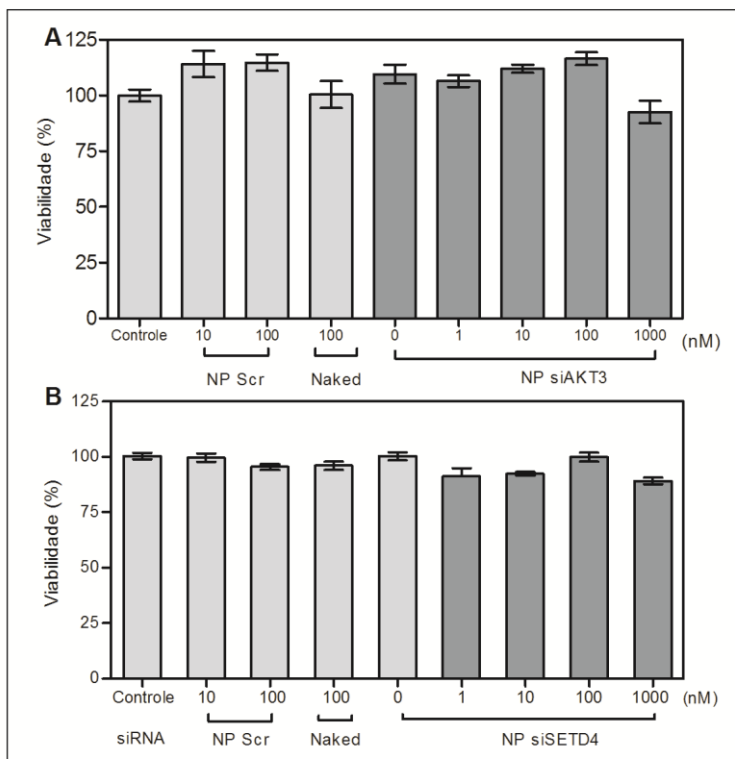
Figura 15 – Viabilidade celular após incubação com nanocarreadores NP PEG-poliânion/siSETD4/CaP em células de câncer de mama MDA-MB 231.



Avaliação da viabilidade celular em células MDA-MB-231. Eixo X: 1ª coluna representa o controle: células não tratadas; 2ª coluna, NP siSCRAMBLE 10nM; 3ª coluna, NP siSCRAMBLE 100nM, 4ª coluna, Naked siSETD4 100nM: siSETD4 livre (não encapsulado); 5ª coluna, Mock: nanopartícula branca; 6ª, 7ª, 8ª, 9ª colunas, NP siSETD4: nanopartícula contendo siSETD4 em diferentes concentrações (1, 10, 100 e 1000nM respectivamente) e eixo Y indica a viabilidade celular (%), em que (A) representa o tratamento em 48h, (B) 72h e (C) 96h. Os controles foram definidos como 100% de viabilidade. * $p < 0,05$ em comparação ao controle, *** $p < 0,001$ (ANOVA seguido de Tukey).

A verificação da toxicidade dos nanocarreadores também foi avaliada utilizando a linhagem celular de fibroblasto, NIH-3T3. Como demonstrado na Figura 16, a formulação não apresentou toxicidade significativa, mesmo nas concentrações mais elevadas de partículas. Embora o CaP seja considerado um constituinte natural, presente em maior quantidade nos ossos e nos dentes, este material, estruturado em partículas, poderia apresentar efeitos tóxicos, como já foi descrito para outros materiais; por exemplo, nanopartículas lipídicas sólidas ou de poliuretano (SILVA et al., 2012; SILVA et al., 2016). Neste sentido, comprovou-se que o CaP promove biocompatibilidade dos sistemas, apresentando inúmeras vantagens para aplicações biomédicas (ASHOKAN et al., 2013; LEE et al., 2014; YOMODA et al., 2014). A inibição da expressão dos genes AKT3 e SETD4 em uma linhagem não tumoral, em que estes genes não estão superexpressos, não acarretou na diminuição da viabilidade celular. Apesar da via PI3K-AKT regular muitos processos celulares não tumorais, incluindo a proliferação celular, sobrevivência, crescimento, motilidade, metabolismo da glicose e a angiogênese, outras vias poderiam compensar por meio de transdução de sinais e, possivelmente, influenciar nos eventos biológicos subsequentes (FRANKE et al., 2003; LUO; MANNING; CANTLEY, 2003).

Figura 16 – Viabilidade celular após incubação com o sistema NP PEG-Poliânion/siRNA/CaP em células não tumorais NIH-3T3.



Avaliação da viabilidade celular em células NIH-3T3. . (A) Eixo X: 1ª coluna representa o controle: células não tratadas; 2ª coluna, NP siSCRAMBLE 10nM; 3ª coluna, NP siSCRAMBLE 100nM, 4ª coluna, Naked siAKT3 100nM: siAKT3 livre (não encapsulado); 5ª coluna, Mock: nanopartícula branca; 6ª, 7ª, 8ª, 9ª colunas, NP siAKT3: nanopartícula contendo siAKT3 em diferentes concentrações (1, 10, 100 e 1000nM respectivamente). (B) Eixo X: 1ª coluna representa o controle: células não tratadas; 2ª coluna, NP siSCRAMBLE 10nM; 3ª coluna, NP siSCRAMBLE 100nM, 4ª coluna, Naked siSETD4 100nM: siSETD4 livre (não encapsulado); 5ª coluna, Mock: nanopartícula branca; 6ª, 7ª, 8ª, 9ª colunas, NP siSETD4: nanopartícula contendo siSETD4 em diferentes concentrações (1, 10, 100 e 1000nM respectivamente). * $p < 0,05$ em comparação ao controle, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ (ANOVA seguido de Tukey).

5.12 AVALIAÇÃO DO SILENCIAMENTO GÊNICO

A eficiência do siRNA contido nas nanopartículas para promover o silenciamento gênico foi verificada avaliando-se os níveis de RNAm em células de câncer de mama MDA-MB-231, através da técnica de PCR quantitativo.

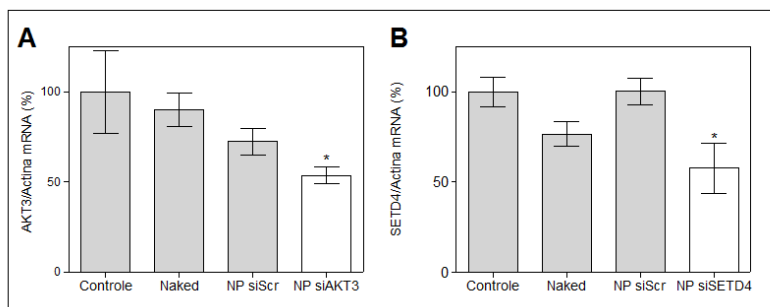
Atualmente, como a quimioterapia é a única opção para o tratamento de câncer de mama triplo-negativo, cujo benefício clínico é limitado (BRASIL, 2016c), o estudo do silenciamento dos genes AKT3, bem como do gene SETD4 através de RNAi emerge como grande potencial para a melhora do prognóstico de câncer de mama. Além disso, a via PI3K-AKT é conhecida por ser ativada após processo de radiação ionizante, o que confere resistência à radioterapia do câncer. Como resultado, a inibição da sinalização de PI3K e AKT pode aumentar a eficácia da terapia de radiação, em muitos tipos de tumores (SCHUURBIERS, 2009; ZHANG et al., 2010; GUPTA et al., 2003)

As sequências de siRNA escolhidas demonstraram-se eficientes em produzir o efeito de RNAi, uma vez que foi possível observar silenciamento de $46 \pm 13\%$ para o gene AKT3 e $42 \pm 34\%$ para SETD4, quando tratadas com 100nM de siRNA (Figura 17). Os silenciamentos obtidos após a utilização de NP PEG-poliânion/siRNA/CaP podem estar relacionados com o tempo e a concentração utilizados. Como visto nos testes de viabilidade celular, a concentração de 100nM de siRNA promoveu alteração na viabilidade celular apenas após 48h e 72h para AKT3 e SETD4, respectivamente. Portanto, um maior tempo de incubação, ou o aumento da concentração utilizada pode promover um silenciamento mais significativo.

Estes resultados demonstram a capacidade das nanopartículas desenvolvidas em carrear o siRNA para o interior da célula, transpondo as barreiras celulares existentes, como escape endossomal e liberação do siRNA no citosol, uma vez que esta etapa é necessária para que ocorra a ligação ao complexo proteico RISC e consequente degradação do RNAm complementar.

Além disso, é possível concluir que as nanopartículas híbridas foram eficientes na transfecção de células de câncer de mama (Figura 17).

Figura 17 – Expressão dos genes AKT3 e SETD4 em células de câncer de mama após incubação com os nanocarreadores contendo siRNA.



Avaliação da expressão dos genes AKT3 (A) e SETD4 (B) após tratamento com o sistema nanoparticulado, carregando os respectivos siRNA em que a primeira coluna no eixo X representa o Controle (não tratado); 2ª coluna, Naked siRNA 100nM: siRNA não encapsulado; 3ª coluna, NP siSCRAMBLE 100nM: nanopartículas contendo siRNA controle; e 4ª coluna NP siAKT3 ou SETD4: nanopartícula contendo siAKT3 ou SETD4 100nM, como variável resposta, mostra-se no eixo Y a porcentagem relativa de Gene/Actina mRNA (%). O controle foi definido como 100%. * $p < 0,05$ em comparação ao controle e ** $p < 0,01$ (ANOVA seguido de Tukey).

5.13 INTERNALIZAÇÃO CELULAR DAS NANOPARTÍCULAS HÍBRIDAS POR MICROSCOPIA CONFOCAL

Em um processo de transfecção, após a internalização celular, siRNA é entregue aos endossomas primários, seguido dos endossomas tardios / lisossomas para promover a degradação do material. Assim, o escape endossomal é um processo crítico para a eficácia do silenciamento gênico com siRNA exógeno (WHITEHEAD; LANGER; ANDERSON, 2009).

Na figura 18, mostra-se imagens de células MDA-MB-231, tratadas com nanopartículas encapsulando 200 nM de siRNA marcado com cianina 5 e seu respectivo controle (siRNA-Cy5 não encapsulado). O siRNA-Cy5, endossomos/lisossomos e os núcleos são mostrados em vermelho, verde e azul, respectivamente. *Pixels* amarelos resultam na fusão de *pixels* vermelhos e verdes, indicando a co-localização de Cy5-siRNA com endossomos / lisossomos.

As imagens das células tratadas com as nanopartículas exibem regiões vermelhas e/ou amarelas com 24h de incubação, indicando que houve absorção celular de Cy5-siRNA.

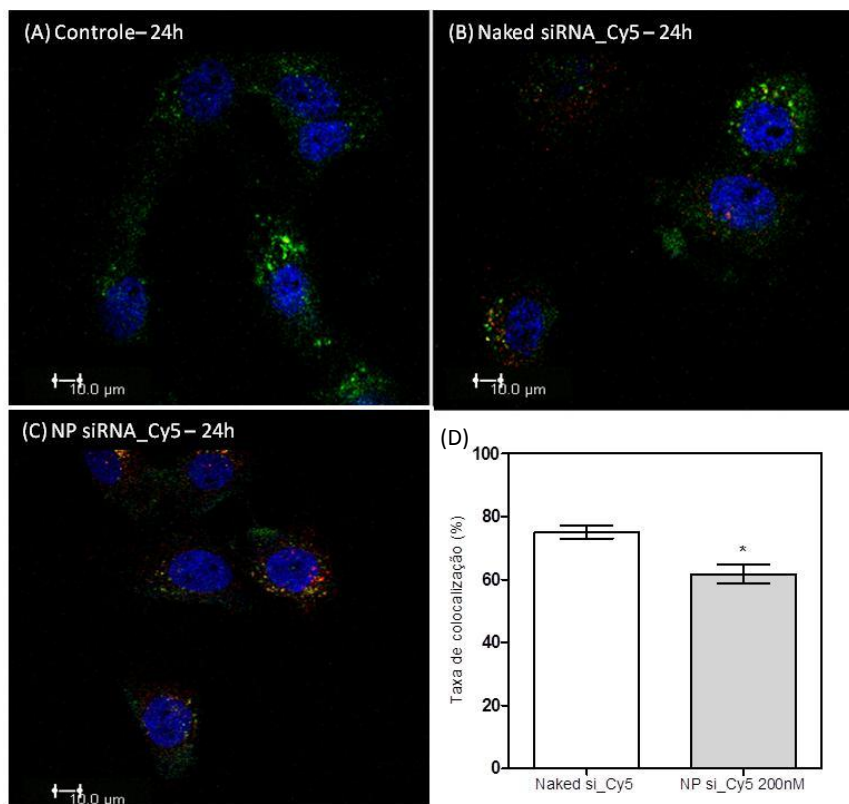
A presença de pontos vermelhos no tratamento com siRNA livre pode ser explicada devido a disponibilidade de siRNA e/ou Cy5 no meio de cultura celular, favorecida pela entrada na célula por pinocitose, processo pelo qual a célula capta o que está no meio extracelular por meio de vesículas. No entanto, o baixo pH lisossomal promove a degradação destas moléculas, impedindo o silenciamento gênico por RNAi (WATTIAUX et al., 2000).

Além disso, a taxa de co-localização do tratamento com siRNA *Naked* é significativamente superior quando comparado com o sistema nanoparticulado sugerindo que o nanocarreador foi eficaz em promover o escape endossomal, liberando o siRNA para o citosol (pontos vermelhos).

O escape endossomal ocorre pela alta concentração de íons cálcio nas nanopartículas, que quando dissolvidas, libera o seu conteúdo, ocorrendo um intenso influxo de íons e água para o interior do endossomo, o que provavelmente promove a ruptura da membrana endossomal com o passar do tempo, devido ao aumento da pressão osmótica (HUBBELL, 2003; PITTELLA et al., 2011). Desta forma, sugere-se que a liberação de siRNA das nanopartículas ocorra apenas nas condições biológicas de íons e pH, dos endossomas, como visto pelo presente ensaio.

Os dados obtidos corroboram os resultados de silenciamento gênico, já que demonstraram a capacidade dos sistemas nanoparticulados em carrear siRNA, promover o escape endossomal, liberar o siRNA de maneira controlada em pH reduzido e diminuir a expressão de genes alvo.

Figura 18 – Localização intracelular das nanopartículas por microscopia confocal.



Células de câncer de mama MDA-MB-231: (A) Células sem tratamento (B) 200 nM de Naked siRNA_Cy5, (C) NP contendo 200 nM de siRNA_Cy5. A coloração azul representa a marcação do núcleo com DAPI, verde a marcação do endossomo\lisossomo com Lysotracker, e a vermelha representa o siRNA_Cy5. (D) Taxa de co-localização de siRNA_Cy5 com endossomo\lisossomo.

6. CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos, novas nanopartículas carreadoras de siRNA e constituídas de CaP e blocos de copolímeros foram preparadas por auto-associação com sucesso. Os testes demonstraram que foi possível prepará-las de maneira reprodutível, com baixo custo de produção e boa eficiência para realizar a transfecção de células de câncer de mama *in vitro*. Por utilizar materiais biocompatíveis, as nanopartículas apresentam baixa ou nenhuma citotoxicidade, estabilidade coloidal, eficiência na entrega de ácidos nucleicos em células, liberação controlada no sítio alvo para efeito RNAi efetivo..

Além disso, este nanocarreador, utilizado para transfecção e silenciamento de genes-chave na proliferação de células de câncer de mama triplo-negativas, pode proporcionar uma nova opção de tratamento para este subtipo de tumor, através do efeito de RNAi.

Portanto, as nanopartículas híbridas desenvolvidas são candidatas promissoras para a entrega de siRNA para células de câncer de mama e servem como base para futuras modificações estruturais a fim de aumentar sua eficiência.

7. PERSPECTIVAS

O sistema nanocarreador em questão foi preparado para a transfecção de células *in vitro*, bem como para futura aplicação *in vivo*. Para a aplicação *in vivo*, a purificação do sistema é utilizada antes de sua administração. Pode ainda ser aplicado visando a ciência básica como reagente de transfecção celular, na pesquisa de vias metabólicas, rotas genéticas e outras.

A fim de dar continuidade a este trabalho, tem-se como perspectivas:

- Realizar modificações na quantidade e estrutura do polímero para aumentar a porcentagem de incorporação, escape endossomal e, como consequência, silenciamento gênico;
- Avaliar a presença *in vitro* da proteína AKT3 e SETD4 após silenciamento gênico através de *western blot*;
- Avaliar a eficácia antitumoral *in vivo* do sistema;
- Avaliar o silenciamento gênico e a expressão das proteínas em tumores sólidos *in vivo*;
- Avaliar a entrega de outros genes envolvidos com o desenvolvimento do câncer, utilizando as nanopartículas híbridas, em células MDA-MB-231 e em outras linhagens celulares.

8. REFERÊNCIAS

ABDELWAHED, W.; DEGOBERT, G.; FESSI, H. A pilot study of freeze drying of poly(epsilon-caprolactone) nanocapsules stabilized by poly(vinyl alcohol): Formulation and process optimization. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 309, n. 1–2, p. 178-188, 2006.

ABOU-JAWDE, R. et al. An overview of targeted treatments in cancer. **Clinical Therapeutics**, v. 25, n. 8, p. 2121-2133, ago. 2003.

ALBERT, M.; HELIN, K. Histone methyltransferases in cancer. **Seminars In Cell & Developmental Biology**, v. 21, n. 2, p.209-220, nov. 2009.

ALLEN, T. M. Drug Delivery Systems: Entering the Mainstream. **Science**, v. 303, n. 5665, p.1818-1822, mar. 2004.

AMERES, S. L.; MARTINEZ, J; SCHROEDER, R. Molecular basis for target RNA recognition and cleavage by human RISC. **Cell**, v.130, n.1, p. 101–112, jul. 2007.

AMERICAN CANCER SOCIETY. **Breast Cancer Prevention and Early Detection**. 2016a. Disponível em: <http://www.cancer.org/acs/groups/cid/documents/webcontent/003165-pdf.pdf>. Acesso em: jan. 2016.

AMERICAN CANCER SOCIETY. How is breast cancer treated? 2016b. Disponível em: <http://www.cancer.org/cancer/breastcancer/detailedguide/breast-cancer-treating-general-info> >. Acesso em: jan. 2016.

ANSA, B. et al. Beliefs and Behaviors about Breast Cancer Recurrence Risk Reduction among African American Breast Cancer Survivors. **International Journal Of Environmental Research And Public Health**, v. 13, n. 1, p.1-11, 23 dez. 2015.

ASHOKAN, A. et al. Multifunctional calcium phosphate nano-contrast agent for combined nuclear, magnetic and near-infrared in vivo imaging. **Biomaterials**, v. 34, n. 29, p. 7143-57, jun. 2013.

BAE, Y. et al. Design of environment-sensitive supramolecular assemblies for intracellular drug delivery: polymeric micelles that are responsive to intracellular pH change. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 42, p. 4640–4643. out. 2003.

BELLACOSA, A et al. Activation of AKT kinases in cancer: Implications for therapeutic targeting. **Advances in Cancer Research**, v. 94, p. 29-86, 2005.

BENSON, J.R.; JATOI, I. The Global Breast Cancer Burden. **Future Oncology**, v. 8, n. 6, 2012.

BERNSTEIN, E. et al. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. **Nature**, v. 409, n. 6818, p. 363–366, jan. 2001.

BIESINGER, M. C. et al. Resolving surface chemical states in XPS analysis of first row transition metals, oxides and hydroxides: Cr, Mn, Fe, Co and Ni. **Applied Surface Science**, v. 257, n. 7, p.2717-2730, jan. 2011.

BLANCO, E.; FERRARI, M. Emerging nanotherapeutic strategies in breast cancer. **The Breast**, v.23, n.1, p. 10-18, nov. 2014.

BLUMENTHAL, N. C.; POSNER, A. S.; BETTS, F. Formation and structure of synthetic and bone hydroxyapatite. **Progress in Crystal Growth and Characterization of Materials**, v. 3: p. 49–64, jun. 1980.

BOSWELL, K.A. et al. Disease burden and treatment outcomes in second-line therapy of patients with estrogen receptor-positive (ER+) advanced breast cancer: A review of the literature. **The Breast**, v.21, n.6, p. 701-706, out. 2012.

BRASIL. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. **Estimativa 2016: Incidência de Câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: Ministério da Saúde, 2015.

BRASIL. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. **Tipos de câncer: Mama**. Rio de Janeiro: Ministério da Saúde, 2016a. Disponível em: <
http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/ma/ma/cancer_mama>. Acesso em: 01 fev. 2016.

BRASIL. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. **Controle do câncer de mama**. Rio de Janeiro: Ministério da Saúde, 2016b. Disponível em: <
http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/acoes_programas/site/home/nobrasil/programa_controle_cancer_mama/tratamento>. Acesso em: 01 fev. 2016.

BRASIL. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. **Contra o triplo-negativo**. Rio de Janeiro: Ministério da Saúde, 2016c. Disponível em: <
http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/fed3dc004eb693de8abc9af11fae00ee/26_ciencia.pdf?MOD=AJPERES>. Acesso em: 01 fev. 2016.

BRIANE, D. et al. Inhibition of VEGF expression in A431 and MDA-MB-231 tumour cells by cationic lipid-mediated siRNA delivery. **Journal of Drug Targeting**, v. 20, n. 4, p.347-354, maio 2012.

BROGNARD, J.; HUNTER, T. Protein kinase signaling networks in cancer. **Current Opinion in Genetics & Development**, v. 21, p.4–11, fev. 2011

CARNERO, A. The PKB/AKT Pathway in Cancer. **Current Pharmaceutical Design**, v. 16, n. 1, p.34-44, jan. 2010.

CDC. Centers for Disease Control and Prevention. **Breast Cancer**. Disponível em:

http://www.cdc.gov/cancer/breast/basic_info/risk_factors.htm . Acesso em: fev. 2016.

CHEN, W. et al. Synthesis and in vitro anticancer activity evaluation of novel bioreversible phosphate inositol derivatives. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 93, p.172-181, mar. 2015.

CHIN, Y.R. et al. Targeting Akt3 signaling in triple-negative breast cancer. **Cancer Research**, v. 74, n.3, p. 964-973, 2014.

COLEY, H. M. Mechanisms and consequences of chemotherapy resistance in breast cancer. **European Journal of Cancer, Supplement**,v.7, n. 1, p. 3-7, mar. 2009.

CORN, B.W. Advances in the combination of radiation therapy and chemotherapy against cancer. **Drug News & Perspectives**, v. 17, n.7, p. 469-475, 2004.

DAVIS M. E. et al. Evidence of RNAi in humans from systemically administered siRNA via targeted nanoparticles. **Nature**, v. 464, p.1067–1070, mar. 2010.

DE LEEUW, N.H. Local ordering of hydroxyl groups in hydroxyapatite. **Chemical Communications**, v. 17, p. 1646–1647. ago. 2001

DEVINCENZO J. et al. Evaluation of the safety, tolerability and pharmacokinetics of ALN-RSV01, a novel RNAi antiviral therapeutic directed against respiratory syncytial virus (RSV). **Antiviral Research**, v. 77, p. 225-23, dez. 2008.

DILLON, S. C. et al. The SET-domain protein superfamily: protein lysine methyltransferases. **Genome Biology**, v. 6, n. 8, p.1-22, ago. 2005.

DUNCAN, R. The dawning era of polymer therapeutics. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 2, n. 5, p.347-360, maio 2003

DYKXHOORN, D. M.; NOVINA, C. D.; SHARP, P. A.. Killing the messenger: short rnas that silence gene expression. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 4, n. 6, p.457-467, jun. 2003.

DYKXHOORN, D. M.; PALLISER, D.; LIEBERMAN, J. The silent treatment: siRNAs as small molecule drugs. **Gene Therapy**, v. 13, p.541-552, mar. 2006.

EC. European Commission. Commission Recommendation of 18 October 2011 on the definition of nanomaterials. **Official Journal of the European Union**, v. 54, p.38-40, out. 2011.

ECHEVERRI, C. J.; PERRIMON, N. High-throughput RNAi screening in cultured cells: a user's guide. **Nature Reviews Genetics**, v. 7, p.373-384, maio 2006.

ELBASHIR, Sayda M. et al. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. **Nature**, v. 411, p. 494-498, abr. 2001.

ELSABAHY,M. et al. Synthesis and Enzymatic Stability of PEGylated Oligonucleotide Duplexes and their Self-assemblies with Polyamidoamine Dendrimers. **Soft Matter**, v. 4, n. 2, p. 294-302, 2008.

FARIA , J. A. et al. SET domain-containing Protein 4 (SETD4) is a Newly Identified Cytosolic and Nuclear Lysine Methyltransferase involved in Breast Cancer Cell Proliferation. **Journal of Cancer Science & Therapy**, v. 5, n. 2, p.58-65, jan 2013.

FERLAY, J. et al. **Cancer incidence and mortality worldwide: IARC CancerBase. GLOBOCAN**, v.1, n. 11, 2012.

FERLAY, J. et al. Estimatives of worldwide burden of câncer in 2008. Globocan 2008. **International Journal of Cancer**. v. 127, n. 12, p. 2893-2917, 2010.

FIRE, A. et al. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. **Nature**, v. 391, n. 6669, p. 806-811, fev. 1998.

FISCHLE, W.; WANG, Y. ALLIS, C. D. Histone and chromatin crosstalk. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 15, n. 9, p.172-183, abr. 2003.

FONTE, P.; REIS, S.; SARMENTO, B. Facts and evidences on the lyophilization of polymeric nanoparticles for drug delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 225, p.75-86, mar. 2016

FOUGEROLLES, A. de et al. Interfering with disease: a progress report on siRNA-based therapeutics. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 6, n. 6, p.443-453, jun. 2007.

FRANKE, T.F. et al. PI3K/Akt and apoptosis: Size matters. **Oncogene**, v. 22, n. 56, p. 8983-8998, dez. 2003.

FRESHNEY, R. **Culture of animals cells: A manual of basic technique**. New York: 1987.

FRITZ, G. et al. Electrosteric Stabilization of Colloidal Dispersions. **Langmuir**, v. 18, p. 6381-6390, abr. 2002.

GANZ, P.A. et al. Physical and psychosocial recovery in the year after primary treatment of breast cancer. **Journal of Clinical Oncology**, v. 29, n. 9, p. 1101-1109, fev. 2011.

GHAFFARI, A. et al. A novel role for ezrin in breast cancer angio/lymphangiogenesis. **Breast Cancer Research**, v. 16, n. 5, p.438, set. 2014.

GIACCA, M; ZACCHIGNA, S. Virus-mediated gene delivery for human gene therapy. **Journal of Controlled Release**, v. 161, n.2, p. 377-388, abr. 2012.

GOBBI, H. **Classificação dos tumores da mama**: atualização baseada na nova classificação da Organização Mundial da Saúde de 2012. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, v. 48, n. 6, p.463-474, dez. 2012.

GOOCH, J. W. **Encyclopedic Dictionary of Polymers**. Springer:2011.

GRAHAM, F. L.; VAN DER EB, A. J. A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA. *Virology*, v. 52, n. 2, p. 456-467, 1973.

GUO, J. et al. Can non-viral technologies knockdown the barriers to siRNA delivery and achieve the next generation of cancer therapeutics? **Biotechnology Advances**, v. 29, n.4, p. 402-417, mar. 2011.

GUPTA A. K. et al. Radiation sensitization of human cancer cells in vivo by inhibiting the activity of PI3K using LY294002. **International Journal of Radiation Oncology Biology Physics**, v. 56, n. 3, p.846–853, jul. 2003.

HANADA, M.; FENG, J.; HEMMINGS, B.A. Structure, regulation and function of PKB/AKT-a major therapeutic target. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1697, n.1-2, p.3-16, mar. 2004.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R.A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, v. 144, n.5, p. 646-674, mar. 2011.

HANNON, G. J. RNA interference. **Nature**, v. 418, n. 6894, p. 244-51, jul. 2002.

HUANG, Y. et al. Epigenetics in breast cancer: what's new? **Breast Cancer Research**. V. 13, n.6, 225, p.1-34. nov. 2011.

HUBBELL, J. A. Materials science. Enhancing drug function. **Science**, v. 300, n. 5619, p. 595-596, abr. 2003.

HUESKEN, D. et al. Design of a genome-wide siRNA library using an artificial neural network. **Nature Biotechnology**. v. 23, p.995–1001, ago. 2005.

IVANOV, M. R. **Covalently functionalized gold nanoparticles: synthesis, characterization , and integration into capillary electrophoresis**. Iowa Research Online, University of Iowa, maio 2011.

IVANOV, M. R.; BEDNAR, H. R.; HAES, A. J. Investigations of the Mechanism of Gold Nanoparticle Stability and Surface Electrophoresis. **ACS Nano**, v. 3, n. 2, p.386–394, fev. 2009

IWASE, H. et al. Clinicopathological analyses of triple negative breast câncer using surveillance data from the Registration Committee of the Japanese Breast Cancer Society. **Breast Cancer**, v. 17, n.2, p. 118–124, maio 2010.

JENUWEIN, T.; ALLIS, C.D. Translating the histone code. **Science**. v. 293, n. 5532, p.1074–1080, ago. 2001.

JO, S. Y. et al. Effects of various toothpastes on remineralization of white spot lesions. **The Korean Journal of Orthodontics**, v. 44, n. 3, p.113-118, maio 2014.

JORALEMON M.J.; MCRAE, S.; EMRICK, T. PEGylated polymers for medicine: from conjugation to self-assembled systems. **Chemical Communications**, v. 46, n.9, p.1377–1393, jan. 2010.

KAKIZAWA Y.; KATAOKA K. Block copolymer self-assembly into monodispersive nanoparticles with hybrid core of antisense DNA and calcium phosphate. **Langmuir**, v. 18, n. 12, p. 4539-4543, maio 2002.

KAKIZAWA, Y. et al. Size-controlled formation of a calcium phosphate-based organic-inorganic hybrid vector for gene delivery using poly(ethylene glycol)-block-poly(aspartic acid). **Advanced Materials**, v.16, n. 8, p.699-702, abr. 2004.

KAKIZAWA, Y; FURUKAWA, S; KATAOKA, K. Block copolymer-coated calcium phosphate nanoparticles sensing intracellular environment for oligodeoxynucleotide and siRNA delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 97,n.2, p. 345-356, jun. 2004.

KANASTY, R. et al. Delivery materials for siRNA therapeutics. **Nature Materials**, v. 12, n. 11, p.967-977, out. 2013.

KASAJOVA, P, et al. Active cigarette smoking and the risk of breast cancer at the level of N-acetyltransferase 2 (NAT2) gene polymorphisms. **Tumor Biology**, p.1-9, dez. 2015.

KATAOKA, K.; HARADA, A.; NAGASAKI, Y. Block copolymer micelles for drug delivery: design, characterization and biological significance. **Advanced Drug Delivery Review**. v. 47, n.1, p. 113-131. mar. 2001.

KHVOROVA, A., REYNOLDS, A., JAYASENA, S.D. **Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias**. *Cell.*, v. 115, n. 2, p. 209-216, out. 2003.

KIM, S.H. et al. Local and systemic delivery of VEGF siRNA using polyelectrolyte complex micelles for effective treatment of cancer. **Journal of Controlled Release**, v. 129, n.2, p. 107-116, mar. 2008.

KOHORI F. et al. Control of adriamycin cytotoxic activity using thermally responsive polymeric micelles composed of poly(N-isopropylacrylamide-co-N,Ndimethylacrylamide)-b-poly(D,L-lactide). **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 16, p. 195–205, nov. 1999.

KORNBERG, A. Inorganic polyphosphate: toward making a forgotten polymer unforgettable. **Journal of Bacteriology**, v. 177, n. 3, p. 491-6, fev. 1995.

KOSEOGLU, Sandra et al. AKT1, AKT2 and AKT3-Dependent Cell Survival is Cell Line-Specific and Knockdown of All Three Isoforms Selectively Induces Apoptosis in 20 Human Tumor Cell Lines. **Cancer Biology & Therapy**, v. 6, n. 5, p.755-762, fev. 2007.

KOZLOVA, D.; EPPL, M. Biological targeting with nanoparticles: state of the art. **Bionanomaterials**, v. 14, n. 3-4, p. 161-170, dez. 2013.

KUMTA, P. N. et al. Nanostructured calcium phosphates for biomedical applications: novel synthesis and characterization. **Acta Biomaterialia**, v. 1, n. 1, p.65-83, jan. 2005.

LARSEN, P.B; KUMLER, I. NIELSEN, D.L. A systematic review of trastuzumab and lapatinib in the treatment of women with brain metastases from HER2-positive breast cancer. **Cancer Treatment Reviews**, v. 39, n. 7, p.720-727, mar. 2013.

LEE, B. L. et al. Breast cancer in Brazil: present status and future goals. **Lancet Oncology**, v. 13, n. 3, p. 95-102, mar. 2012.

LEE, M. S. et al. Target-specific delivery of siRNA by stabilized calcium phosphate nanoparticles using dopa-hyaluronic acid conjugate. **Journal of Controlled Release**, v. 192, p. 122-30, out. 2014.

LI, J. et al. Biodegradable calcium phosphate nanoparticle with lipid coating for systemic siRNA delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 142, p. 416-421, nov. 2010.

LIZUKA, M.; SMITH, M. M. Functional consequences of histone modifications. **Current Opinion in Genetics & Development**. v. 13, n. 2, p.154-160, abr. 2003.

LONGLEY, D.B.; JOHNSTON, P. G. Molecular mechanisms of drug resistance. **The Journal of Pathology**, v.205, n.2, p. 275-292, jan. 2005.

LUO, J.; MANNING, B.D.; CANTLEY, L.C. Targeting the PI3K-Akt pathway in human cancer: Rationale and promise. **Cancer Cell**, v. 4, n. 4, p. 257-262, out. 2003.

LYMAN, C. E. **Scanning Electron Microscopy, X-Ray Microanalysis, and Analytical Electron Microscopy: A Laboratory Workbook**. New York: Plenum Press, 1990.

MAEDA, H. Tumor-Selective Delivery of Macromolecular Drugs via the EPR Effect: Background and Future Prospects. **Bioconjugate Chemistry**, v. 21, n. 5, p.797-802, maio 2010.

MAIRA, M.S. et al. Cancer Biology, In: **Comprehensive Medicinal Chemistry II**. Elsevier, ISBN, v. 7, p. 1-31, 2007.

MAITRA A. Calcium phosphate nanoparticles: second-generation nonviral vectors in gene therapy. **Expert Review of Molecular Diagnostics**, v. 5, n.6, p. 893-905, nov. 2005.

MALVERN. **Nanoparticle Tracking Analysis**. 2016a. Disponível em: < <http://www.malvern.com/en/products/technology/nanoparticle-tracking-analysis/>>. Acesso em: fev. 2016.

MALVERN. **Zetasizer Nano ZS**. 2016b. Disponível em: <http://www.malvern.com/labeng/products/zetasizer/zetasizer_nano/zetasizer_nano_zs.htm>. Acesso em: fev. 2016.

MARTELLI, A. M. et al. The emerging multiple roles of nuclear Akt. **Biochimica Et Biophysica Acta (bba) - Molecular Cell Research**, v. 1823, n. 12, p.2168-2178, dez. 2012.

MASIERO, M. et al. RNA interference: implications for cancer treatment. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 28, n. 1, p. 143-66, jan. 2007.

MATRANGA, C. et al. Passenger-strand cleavage facilitates assembly of siRNA into ago2-containing RNAi enzyme complexes. **Cell**, v. 123, n.4, p. 607–620, nov. 2005.

MATSUMURA, Y.; MAEDA, H. A new concept for macromolecular therapeutics in cancer-chemotherapy: mechanisms of tumoritropic accumulation of proteins and the antitumor agent SMANCS. **Cancer Research**, v. 46, p. 6387-6392, dez. 1986.

MEHNERT, W.; MADER, K. Solid lipid nanoparticles: production, characterization and applications. **Advanced Drug Delivery Review**, v. 47, n. 2-3, p. 165-96, abr. 2001.

MELLOR J. Dynamic nucleosomes and gene transcription. **Trends in Genetics**, v. 22, n.6, p.320-329, maio 2006.

MICHOR, F.; NOWAK, M.A.; IWASA, Y. Evolution of resistance to cancer therapy. **Current Pharmaceutical Design**, v. 12, n.3, p. 261-271, 2006.

MIYATA, K.; CHRISTIE, R.J.; KATAOKA, K. Polymeric micelles for nano-scale drug delivery. **Reactive and Functional Polymers**, 71, n.3, p.227-234, mar. 2011.

MOGHIMI, S.M.; HUNTER, A.C.; MURRAY, J.C. Long-circulating and target-specific nanoparticles: theory to practice. **Pharmacological Reviews**, v. 53, n.2, p. 283-318, jun. 2001.

MORRISSEY, D.V. et al. Potent and persistent *in vivo* anti-HBV activity of chemically modified siRNAs. **Nature Biotech**, v. 23, n.8, p. 1002-1007, jul. 2005.

NAM, J. et al. Surface engineering of inorganic nanoparticles for imaging and therapy. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 65, n. 5, p. 622-648, set. 2013.

NANJWADE, B. K et al. Dendrimers: Emerging polymers for drug-delivery systems. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.38, n. 3, p.185-196, out. 2009.

NAPPER, D. H. **Polymeric Stabilization of Colloidal Dispersions**. Academic Press, London, 1983.

NAROD, S. A.; SALMENA, L. BRCA1 and BRCA2 Mutations and Breast Cancer. **Discovery Medicine**, v. 12, n. 66, p.445-453, nov. 2011.

NCI. **National Cancer Institute website** (Org Breast Cancer. 2016. Disponível em: <<http://www.cancer.gov/types/breast>>. Acesso em: 26 jan. 2016.

NICHOLSON, K.M.; ANDERSON, N.G. The protein kinase B/Akt signalling pathway in human malignancy. **Cellular Signalling**, v. 14, n.5, p. 381-395, maio 2002.

OKAMURA, K. et al. Two distinct mechanisms generate endogenous siRNAs from bidirectional transcription in *Drosophila melanogaster*. **Nature Structural & Molecular Biology**, v.15, n.6, p.581-590, maio 2008.

OKUMURA, A.; PITHA, P. M.; HARTY, R. N. ISG15 inhibits Ebola VP40 VLP budding in an L-domain-dependent manner by blocking Nedd4 ligase activity. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 105, n.10, p. 3974–3979, fev. 2008.

OSANI, M. et al. Epigenetic silencing of claudin-6 promotes Anchorage-independent growth of breast carcinoma cells. **Cancer Science**, v.98, n.10, p. 1557-1562, jul. 2007.

PATIL, Y.; PANYAM, J. Polymeric nanoparticles for siRNA delivery and gene silencing. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 367, n. 1-2, p. 195-203, fev. 2009.

PETERSON, C. L.; LANIEL, M.A. Histones and histone modifications. **Current Opinion in Cell Biology**.v.14, n. 4, p.546-551, jul. 2005.

PITTELLA, F. et al. Enhanced endosomal escape of siRNA-incorporating hybrid nanoparticles from calcium phosphate and PEG-block charge-conversional polymer for efficient gene knockdown with negligible cytotoxicity. **Biomaterials**, v. 32, n. 11, p. 3106–3114, jan 2011.

PITTELLA, F. et al. Pancreatic cancer therapy by systemic administration of VEGF siRNA contained in calcium phosphate/charge-

conversional polymer hybrid nanoparticles. **Journal of Control Release**, v. 161, n. 3, p. 868-874, maio 2012.

PITTELLA, F.; KATAOKA, K. Polymeric Micelles for siRNA Delivery: Barriers to Synthetic siRNA Therapeutics. In: HOWARD, Kenneth A. (Ed.). **RNA Interference from Biology to Therapeutics**. Tokyo: Springer, 2013. p. 161-184.

PTASZNIK, A. et al. Short interfering RNA (siRNA) targeting the Lyn kinase induces apoptosis in primary, and drug resistant, BCR-ABL1(+) leukemia cells. **Nature Medicine**, v. 10, n.11, p. 1187-1189, out. 2004.

RAND, T. A. et al. Biochemical identification of Argonaute 2 as the sole protein required for RNA-induced silencing complex activity. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 101, n.40, p. 14385–14389, set. 2004.

REYNOLDS, A. et al. Rational siRNA design for RNA interference. **Nature Biotechnology**, v. 22, n. 3, p.326–330, mar. 2004.

ROSENBERG, S.A. et al. Gene transfer into humans – immunotherapy of patients with advanced melanoma, using tumor-infiltrating lymphocytes modified by retroviral gene transduction. **The New England Journal of Medicine**, v. 323, p. 570–578, ago. 1990

SADAT-SHOJAI, M. et al. Synthesis methods for nanosized hydroxyapatite with diverse structures. **Acta Biomaterialia**, v. 9, n. 8, p.7591-7621, ago. 2013.

SÆTROM, P.; SNØVE, O. A comparison of siRNA efficacy predictors. **Biochemical And Biophysical Research Communications**, v. 321, n. 1, p.247-253, ago. 2004.

SANTI, S.A.; LEE, H. The Akt isoforms are present at distinct subcellular locations. **Cell Physiology - American Journal of Physiology**, v. 298, n.3, p.580-591, mar. 2010.

SASAKI, T. et al. Knockdown of Akt isoforms by RNA silencing suppresses the growth of human prostate cancer cells in vitro and in vivo. **Biochemical And Biophysical Research Communications**, v. 399, n. 1, p.79-83, ago. 2010.

SCHUURBIERS O. C. et al. The PI3-K/AKT-pathway and radiation resistance mechanisms in non-small cell lung cancer. **Journal of Thoracic Oncology**, v. 4, n. 6, p.761-767, jun. 2009.

SCHWARZ, D. S. et al. Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. **Cell**, v. 115, n. 2, p. 199-208, out. 2003.

SHI, J. **Steric Stabilization**. The Ohio State University. ago. 2002.

SILVA, A. H. et al. In vitro biocompatibility of solid lipid nanoparticles. **Science Of The Total Environment**, v. 432, p.382-388, ago. 2012.

SILVA, Adny H. et al. Toxicity and inflammatory response in Swiss albino mice after intraperitoneal and oral administration of polyurethane nanoparticles. **Toxicology Letters**, v. 246, p.17-27, mar. 2016.

SON, B.H. et al. Significance os mismatch repair protein expression in the chemotherapeutic response of sporadic invasive ductal carcinoma of the breast. **Breast Journal**, v. 10, n.1, p. 20-26, jan.-fev. 2004.

SRINIVASAN, C. et al. Stability characterization and appearance of particulates in a lyophilized formulation of a model peptide hormone-human secretin. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 481, n. 1-2, p. 104-113, jan. 2015.

TAVASSOLI, F. A.; DEVILEE, P. (Ed.). **Pathology and Genetics of Tumours of the Breast and Female Genital Organs**. Lyon: Iarcpress, 2003.

TOMANIN, R.; SCARPA, R. Why do we need new gene therapy viral vectors? Characteristics, limitations and future perspectives of viral vectors transduction. **Current Gene Therapy**, v. 4, n. 4, p. 357-371, dez. 2004.

TORCHILIN, V.P. Recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 4, n.2, p. 145–160, fev. 2005.

TRIEVEL, R. C. et al. Mechanism of multiple lysine methylation by the SET domain enzyme Rubisco LSM1. **Nature Structural & Molecular Biology**, v. 10, n. 7, p.545–552, jul. 2003.

USKOKOVIC, V.; USKOKOVIC, D.P. Nanosized hydroxyapatite and other calcium phosphates: Chemistry of formation and application as drug and gene delivery agents. **J Biomed Mater Res B Appl Biomater**, v. 96, n. 1, p. 152-191, jan. 2011.

VAISHNAW, A.K. et al. A status report on RNAi therapeutics. **Silence**, v.1, n. 1, p. 1-14, jul. 2010

VAN DE LOOSDRECHT, A. A. et al. Cell Mediated Cytotoxicity Against U937 Cells by Human Monocytes and Macrophages in a Modified Colorimetric MTT Assay. **Journal of Immunological Methods**, v. 141, p. 15-22, 1991.

VERMA, A.; STELLACCI, F. Effect of Surface Properties on Nanoparticle Cell Interactions. **Small**, v. 6, n. 1, p.12-21, jan. 2010.

VIALE, G. The current state of breast cancer classification. **Annals of Oncology**, v. 23, n. 10, p. 207-210, set. 2012.

WAGNER, C.D. et al. **NIST Standard Reference Database 20**. Version 3.4 (web version), 2003. Disponível em: <http://srdata.nist.gov/xps/>. Acesso em fev. 2016.

WATTIAUX, R. et al. Endosomes, lysosomes: their implication in gene transfer. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 41, n. 2, p.201-208, mar. 2000.

WHITE T.J.; DONG, Z.L. Structural derivation and crystal chemistry of apatites. **Acta Crystallographia**, v. 59, p. 1–16. jan. 2003.

WHITEHEAD, K. A.; LANGER, R.; ANDERSON, D. G. Knocking down barriers: advances in siRNA delivery. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 8, n. 2, p.129-138, fev. 2009.

WHO. World Health Organization. International Agency for Research on Cancer. **Globocan 2012**: Estimated cancer incidence, mortality and prevalence worldwide in 2012. Disponível em:<<http://www.who.int/cancer>>. Acesso em: 01 fev. 2016.

WINKLER, A.W.; HOFF, H. E.; SMITH, P. K. Cardiovascular effects of potassium, calcium, magnesium, and barium: an experimental study of toxicity and rationale of use in therapeutics. **Yale Journal of Biology and Medicine**, v. 13, n.1, p. 123–132, out. 1940

WYSOCKI, P. J.; MACKIEWICZ-WYSOCKA, M.; MACKIEWICZ, A. Cancer gene therapy – state-of-the-art. **Reports of Practical Oncology & Radiotherapy**, v. 7, n.4, p. 149-155, 2002.

YARI, K.; PAYANDEH, M.; RAHIMI, Z. Association of the hypermethylation status of PTEN tumor suppressor gene with the risk of breast cancer among Kurdish population from Western Iran. **Tumor Biology**, p.1-8, dez. 2015.

YOMODA, M. et al. Calcium phosphate cement - gelatin powder composite testing in canine models: Clinical implications for treatment of bone defects. **Journal of Biomaterials Applications**, v. 29, n. 10, dez. 2014.

YUAN, B. et al. siRNA Selection Server: an automated siRNA oligonucleotide prediction server. **Nucleic Acids Research**, v. 32, p.130-134, jul. 2004.

YUE, P. et al. The importance of solidification stress on the redispersibility of solid nanocrystals loaded with harmine. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 480, n. 1-2, p. 107-115, mar. 2015.

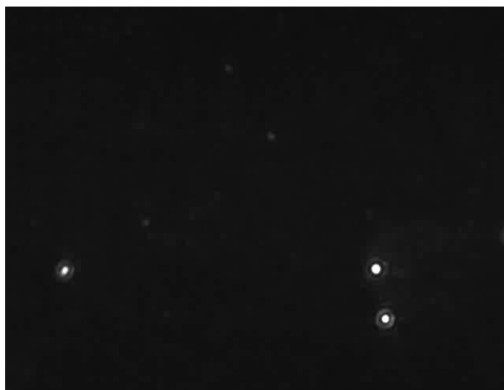
ZHANG ,T. et al. Inhibition of PI3 kinases enhances the sensitivity of non-small cell lung cancer cells to ionizing radiation. **Oncology Reports**, v. 24, n. 6, p.1683–1689, dez. 2010.

ZHANG, J.; LI, X.; HUANG, L. Non-viral nanocarriers for siRNA delivery in breast câncer. **Journal of Controlled Release**, 2014.

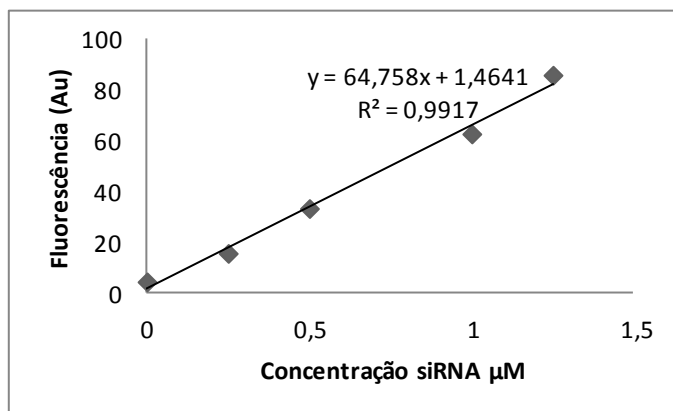
ZHANG, M.; KATAOKA, K. Nano-structured composites based on calcium phosphate or cellular delivery of therapeutic and diagnostic agents. **Nano Today**, v. 4, n. 6 , p.508–517, dez. 2009.

ZHANG, X.; WEN, H.; SHI, X. Lysine methylation: beyond histones. **Acta Biochimica et Biophysica Sinica**, v. 44, n. 1, p.14–27, jan. 2012.

APÊNDICE A – Imagem das nanopartículas híbridas PEG-poliânion/siRNA/CaP

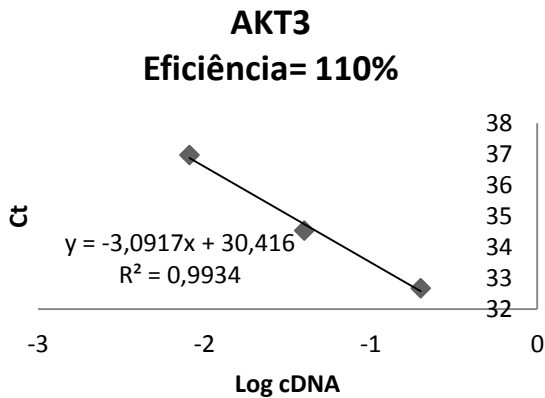
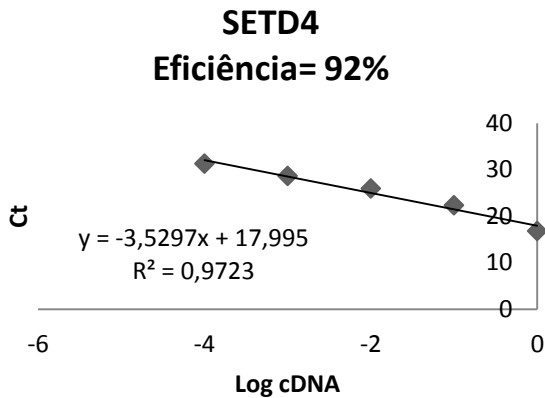


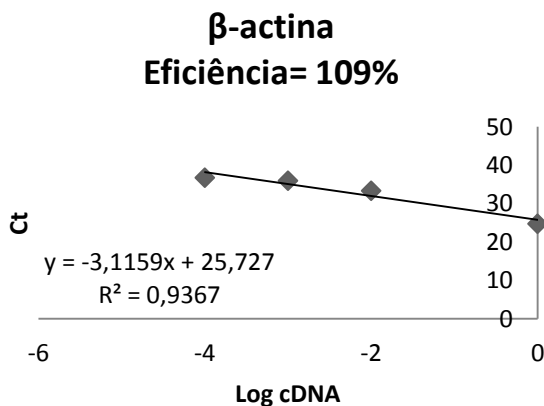
Nanopartículas híbridas PEG-poliânion/siRNA/CaP visualizadas como pontos de luz, pelo vídeo da técnica de Nanoparticle Tracking Analysis.

APÊNDICE B – Curva padrão de siRNA.

Curva analítica realizada por espectrofluorimetria monitorando a molécula fluorescente intercalada ao siRNA (λ excitação= 500 nm e λ de emissão= 525 nm).

APÊNDICE C – Curvas de Eficiência dos iniciadores.





Curvas com diferentes concentrações de cDNA para todos os pares de oligonucleotídeos. A amplificação foi realizada utilizando o Power SYBR-Green PCR Master Mix (Thermo Scientific®), conforme recomendação do fabricante. A análise da regressão linear dos valores de Cts (cycles threshold) em função do logaritmo da respectiva diluição forneceu o coeficiente angular da reta (a, em $y=ax+b$) que foi utilizado para o cálculo da eficiência da amplificação dos produtos.

APÊNDICE D – Processo de submissão ao Instituto Nacional da Propriedade Industrial para pedido de proteção a propriedade intelectual

**Nanopartículas híbridas orgânicas/inorgânicas
estabilizadas por bloco de copolímero para a transfecção de
células *in vitro* e *in vivo***

Trata-se a presente patente da invenção de nanopartículas carreadoras de ácidos nucleicos e moléculas poliônicas, de preparação rápida e simples, com baixa ou nenhuma citotoxicidade e boa estabilidade coloidal, para utilização como agente de transfecção *in vitro* e *in vivo*, com potencial para aplicação em pesquisa e para uso terapêutico humano ou veterinário.

